



Universidade Federal do Maranhão

Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação

Programação de Pós-Graduação em Saúde do Adulto

Mestrado Acadêmico



**ANÁLISE DA AÇÃO ANALGÉSICA DA *Borreria verticillata*
(L.) G. Mey. EM MODELO EXPERIMENTAL DE
OSTEOARTRITE EM RATO**

Marineide Sodré Rodrigues

**São Luís - MA
2019**

MARINEIDE SODRÉ RODRIGUES

**ANÁLISE DA AÇÃO ANALGÉSICA DA *Borreria verticillata*
(L.) G. Mey. EM MODELO EXPERIMENTAL DE
OSTEOARTRITE EM RATO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto da Universidade Federal do Maranhão, para obtenção do Grau de Mestre em Saúde do Adulto e da Criança.

Área de Concentração: Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto

Linha de Pesquisa: Pesquisa Clínica e Cirurgia Experimental

Orientadora: Prof.^a Dra. Maria do Socorro de Sousa Cartágenes

Coorientador: Prof. Dr. João Batista Santos Garcia

Coordenadora: Prof.^a Dra. Maria do Desterro Soares Brandão Nascimento

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Núcleo Integrado de Bibliotecas/UFMA

Sodré Rodrigues, Marineide.

ANÁLISE DA AÇÃO ANALGÉSICA DA *Borreria verticillata* L.
G. Mey. EM MODELO EXPERIMENTAL DE OSTEOARTRITE EM RATO /
Marineide Sodré Rodrigues. - 2019.
62 f.

Coorientador(a): João Batista Santos Garcia.

Orientador(a): Maria do Socorro de Sousa Cartagenes.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em
Saúde do Adulto/ccbs, Universidade Federal do Maranhão,
São Luís, 2019.

1. Analgésica. 2. *Borreria verticillata*. 3.
Osteoartrite. 4. Ratos Wistar. I. de Sousa Cartagenes,
Maria do Socorro. II. Santos Garcia, João Batista. III.
Título.

MARINEIDE SODRÉ RODRIGUES

**ANÁLISE DA AÇÃO ANALGÉSICA DA *Borreria verticillata*
(L.) G. Mey. EM MODELO EXPERIMENTAL DE
OSTEOARTRITE EM RATO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto da Universidade Federal do Maranhão, para a obtenção do Grau de Mestre em Saúde do Adulto e da Criança.

A Banca Examinadora da Defesa da Dissertação de Mestrado, apresentada em sessão pública, considerou a candidata aprovada em: 01/03/2019

Prof.^a Dra. Maria do Socorro de Sousa Cartágenes
(Orientadora) Universidade Federal do Maranhão

Prof. Dr. João Batista Santos Garcia
(Co-orientador) Universidade Federal do Maranhão

Prof. Dr. Thiago Alves Rodrigues
(Examinador) Hospital Universitário da Universidade
Federal do Maranhão

Prof.^a Dra. Flávia Castello Branco Vidal Cabral
(Examinadora) Universidade Federal do Maranhão

Prof. Dr. Marcelo Souza de Andrade
(Examinador) Universidade Federal do Maranhão

Prof.^a Dra. Lilalea Gonçalves França
(Suplente) Universidade Federal do Maranhão

Ao senhor Deus, que até aqui tem me sustentado, renovando minhas forças dia após dia.

Aos meus pais, razão de minha vida, que dignamente me apresentaram à importância da família e ao caminho da honestidade e persistência!

AGRADECIMENTOS

Ao meu Senhor Deus, por renovar minhas forças a cada manhã e por seu infinito amor.

Aos meus pais Martinha e Antônio Inácio pelo apoio e amor incondicional que dedicam a mim ao longo da vida. Vocês são meu exemplo de trabalho e seriedade, por meio de seus ensinamentos desenvolvi este trabalho. Só alcancei meus objetivos, foi porque tive grandes mestres em minha vida como vocês. Para mim, vocês são os principais autores desta obra. Meu muitíssimo obrigada, amo muito vocês!

À Prof.a Socorro Cartágenes por ser responsável pela minha consolidação no ambiente acadêmico e por todos os ensinamentos para a pesquisa e para a vida. Não exagero, você é um grande exemplo de profissional a seguir. Agradeço também por estar disponível a me escutar e conversar, e por oferecer oportunidade de conviver com sua família maravilhosa, Prof.a SOC (nome dado carinhosamente). Muito obrigada!

Aos meus irmãos Helena, Zé Inácio, Eunice, Edilson e Rosa que sempre me apoiaram, respeitaram meu trabalho e que muito me incentivaram e em especial à Maria Lúcia que nunca poupou esforços para me ajudar ao longo dessa jornada. Obrigada minha irmã! Amo vocês!

Aos meus sobrinhos Nayara, Arthur, Rogério, Renata, Adriano (vocês são como filhos para mim) obrigada pelo carinho e incentivo para eu ser uma pessoa melhor a cada dia e a todos os outros sobrinhos. Muito obrigada, amo muito vocês!

Às amigas da Pós-Graduação Kátia Borges, Fernanda Lima, Fernanda Rosa e Danielle Salgado pela amizade e apoio durante essa jornada, acreditem meninas, sem vocês essa batalha teria sido muito mais difícil e aos outros colegas de turma, que não citei, mas que também foram importantes, por terem participado de alguma forma na construção do meu conhecimento científico. Obrigada a todos!

Aos companheiros de pesquisa, membros do Laboratório Experimental de Estudo da Dor (LEED) que hoje são como uma família para mim, todos vocês

contribuíam de alguma forma, para que essa pesquisa acontecesse e em especial aos IC's, por toda sua dedicação nos dias de experimento, pela companhia e apoio tornando tudo mais fácil ao longo desses anos. Muito obrigada a todos!

Aos membros da minha banca por aceitarem o convite de participarem desse momento de extrema importância para mim e contribuíram com minha formação profissional. Obrigada!

Aos professores e coordenação do PPGSAD por toda dedicação e contribuição acadêmica, proporcionando a mim e aos colegas da turma 14 oportunidades para chegarmos até aqui, mais fortes e vitoriosos. Muito obrigada!

Aos meus familiares, pelo apoio e incentivo, em especial à minha madrinha tia Cléide e às minhas amadas primas Thaci Tati e Nita, sempre me apoiando com palavras de muita força e sabedoria. Obrigada, amo vocês!

A todas as minhas amigas e amigos especiais, pela amizade sincera, ensinamentos, por estarem sempre dispostos a me ouvir, dizerem belas palavras de incentivo, força e perseverança, por torcerem pela minha vitória e por me mostrarem que não existe vitória sem luta! MUITÍSSIMO obrigada, principalmente pela generosidade e preocupação de TODAS e TODOS.

“Tudo quanto te vier à mão para fazer, faze-o conforme as tuas forças, porque na sepultura, para onde tu vais, não há obra nem projeto, nem conhecimento, nem sabedoria alguma” – Eclesiastes 9:10

Resumo

A osteoartrite (OA) é a forma mais comum de doença articular alterando a qualidade de vida, sendo a causa mais frequente de dor musculoesquelética para as atividades de vida diária e laborativas no Brasil e no mundo, se tornando um problema de saúde com implicações socioeconômicas. A OA não possui cura e tem apresentado um impacto direto na economia em decorrência dos elevados gastos públicos com medicamentos e cuidados hospitalares. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito analgésico e terapêutico do extrato hidroetanólico bruto (EHBv) e fração acetato de etila (FAc) de *Borreria verticillata* (L.) G. Mey. (BV) em modelo experimental de OA em joelhos de ratos. Os animais foram distribuídos em sete grupos com 6 animais cada, totalizando 42 animais. Foi induzida OA com uma única injeção intra-articular de Monoiodoacetato de sódio (MIA) no joelho direito em seis grupos (Salina, Melox, EHBv, FAc 5mg, FAc 2,5mg, Ácido ursólico (AU) e no sétimo grupo (sem OA) não foi induzida. A partir do 3º dia após a indução, os animais foram tratados até o 28º dia, por gavagem (via oral) com extrato e frações de BV nas seguintes doses EHBv 500mg/kg/dia, FAc 5mg/kg/dia, FAc 2,5mg/kg/dia e AU 10mg/Kg/dia e Meloxicam 7,5mg/kg/dia. Para avaliação clínica comportamentais utilizou-se os parâmetros de: atividade motora/deambulação forçada, quantificação de dor espontânea e avaliação da alodinia mecânica; análise da incapacitância/ distribuição do peso nas patas traseiras e hiperalgesia mecânica. O estudo farmacológico atenuou significativamente as manifestações comportamentais de dor nos animais tratados com o extrato e suas frações em comparação com o grupo salina (0,1ml/Kg) sugerindo uma ação analgésica da BV. A espécie *Borreria verticillata* (L.) G. Mey. para o tratamento de Osteoartrite, revela ser um composto promissor para o desenvolvimento de fármacos utilizados para analgesia, podem ser úteis no tratamento de diferentes tipos de dores e como adjuvantes para medicamentos convencionais.

Palavras-chaves: *Borreria verticillata*; Osteoartrite; analgésica; Ratos Wistar

Abstract

Osteoarthritis (OA) is the most common form of joint disease by changing the quality of life, being the most frequent cause of musculoskeletal pain for the activities of daily living and labor activity in Brazil and in the world, becoming a health problem with implications socioeconomic. OA has no cure and has a direct impact on the economy as a result of high public spending with medicines and hospital care. The aim of this study was to evaluate the analgesic effect and extract raw to evaluate therapeutic (EHBv) and ethyl acetate fraction (FAc) of *Borreria verticillata* (L.) g. Mey. (BV) in experimental model of OA in the knees of rats. The animals were divided into seven groups with 6 animals each, totaling 42 animals. Was induced OA with a single intra-articular injection of sodium Monoiodoacetato (MIA) in his right knee in six groups (Salina, Melox, EHBv, FAc 5 mg, FAc 2, 5 mg, ursolic Acid (AU) and the 7th Group (no OA) was not induced. From the 3rd day after induction, the animals were treated until the 28th day, by gavage (mouth) with extract and fractions of BV in the following EHBv doses 500 mg/kg/day, 5 mg/kg/day FAc, FAc 2, 5 mg/kg/day and AU 10 mg/Kg/day and Meloxicam 7, 5 mg/kg/day. Clinical behavioral assessment used the parameters of: motor activity/forced ambulation, quantification of spontaneous pain and evaluation of mechanical allodynia; analysis of incapacitância/weight distribution on the hind legs and mechanical hyperalgesia. The pharmacological study significantly mitigated the behavioral manifestations of pain in animals treated with the extract and its fractions compared with the saline Group (0, 1 ml/Kg) suggesting an analgesic action of BV. The species *Borreria verticillata* (L.) g. Mey. for the treatment of osteoarthritis, reveals himself to be a promising compound for the development of drugs used for analgesia, can be useful in the treatment of different types of pains and as adjuvants for conventional medicines.

Keywords: *Borreria verticillata*, Osteoarthritis, Analgesic, Wistar Rats

Lista de Ilustrações

Figura 1 Via ascendente da dor	15
Figura 2. Espécie vegetal <i>Borreria verticillata</i> (L.) G. Mey.....	19
Figura 3 Fluxo de obtenção do Extrato Hidroalcoólico de <i>Borreria verticillata</i> (EHBv) e Fração de Acetato de etila (FAc).....	41
Figura 4 Detalhamento da distribuição dos grupos do desenho experimental.....	44
Figura 5 Esquema representativo do delineamento experimental	44
Figura 6- Avaliação da atividade motora dos animais com osteoartrite e tratados com Extrato e fração de <i>Borreria verticillata</i> (L.) G. Mey.	48
Figura 7- Avaliação de incapacitância animais com osteoartrite e tratados com Extrato e fração de <i>Borreria verticillata</i> (L.) G. Mey.....	49
Figura 8- Avaliação da hiperalgesia mecânica dos animais com osteoartrite e tratados com extrato e fração de <i>Borreria verticillata</i> (L.) G. Mey..	50
Figura 9 - Avaliação da sensibilidade tátil dos animais com osteoartrite e tratados com extrato e fração de <i>Borreria verticillata</i> (L.) G. Mey.	51
Figura 10- Graus radiográfico de ratos tratados com frações e extratos de <i>Borreria verticillata</i> (L.) G. Mey. Os valores estão indicados em médias $\pm$ S.E.M (n=6).	52

Sumário

1. INTRODUÇÃO	12
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	14
3.1 Osteoartrite	14
3.2 Uso de plantas medicinais	18
3.3 <i>Borreria verticillata</i> (L.) G. Mey.....	19
3. MODELOS EXPERIMENTAIS.....	21
4. OBJETIVOS.....	24
2.1 Geral.....	24
2.2 Específicos.....	24
REFERÊNCIAS	25
5. ARTIGO I	35
6. CONCLUSÃO.....	61
ANEXO A – Certificado do Comitê de Ética.....	62

1. INTRODUÇÃO

A osteoartrite (OA) é reconhecida como uma das doenças crônicas mais prevalentes afetando articulações das mãos, joelhos, quadris e coluna com diferentes graus de deformidades e edema articulares. A maior compreensão acerca da fisiopatologia da OA tem feito com que o seu clássico conceito de doença degenerativa articular venha sendo gradativamente modificado, enfatizando fenômenos mecânicos e inflamatórios em sua gênese e manutenção (FELSON, 2013; BERENBAUM, 2013).

Trata-se de uma doença articular crônica progressiva e degenerativa, muito comum em idosos (BERENBAUM, 2013). É caracterizada pela deteriorização progressiva da cartilagem articular evoluindo com formação de osteófitos, remodelamento ósseo nas superfícies e margens articulares, e fibrose periarticular. Tais sinais e sintomas culminam na redução da qualidade de vida do indivíduo acometido (YU et al., 2013).

Já foram tentados alguns tipos de tratamentos clínicos e cirúrgicos para a OA, outros estão em estudo, mas até o momento não há uma terapêutica que resulte em uma recuperação definitiva ou uma cura das lesões das articulações, podendo haver necessidade de colocação de próteses metálicas nos joelhos, nos casos mais graves. A terapêutica usada tem como objetivo apenas tratar os sintomas, melhorar a mobilidade articular, diminuir a dor e melhorar qualidade de vida do paciente (TORRES L et al., 2009)

Nesse sentido, a fitoterapia e as plantas medicinais vem sendo tratadas como alternativa de tratamento para a osteoartrite (ZHANG W et al., 2016). O uso dos anti-inflamatórios esteriodais e não esteriodais, quando comparada ao uso das plantas medicinais e fitoterápicos, demonstra que as plantas medicinais ainda desempenham um pequeno papel na terapia de tratamento desta doença (ROSA C, 2007).

O uso de plantas medicinais é regulamentado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), órgão do Ministério da Saúde, que publica resoluções que regulam quais, quando e como as chamadas “drogas vegetais” devem ser usadas, através do uso de suas partes como: folhas, cascas, raízes ou flores, como

opção terapêutica, no Sistema Único de Saúde (BRASIL, 2006) para o tratamento de doenças agudas e crônicas (DUTRA RC et al., 2016).

Entretanto, a ascensão da Fitoterapia fundamenta-se na valorização das tradições populares e nos avanços da prospecção biotecnológicas, esclarecendo os efeitos dos fitocomplexos com ação em alvos moleculares, determinando, dessa forma, o potencial de eficácia terapêutica (BRASIL, 2017).

No Brasil, o potencial econômico da flora brasileira já era percebido desde 1896, por sua riqueza na diversidade de tipos de plantas produtoras dos mais diferentes insumos, bem como o seu potencial medicinal de várias espécies (DUTRA et al., 2016).

Dentre essas espécies, destacamos a *Borreria verticillata* (L.) G. Mey., conhecida como vassourinha-de-botão, encontrada em regiões tropicais e subtropicais, está entre as espécies vegetais brasileiras com atividades biológicas relevante (antibacteriana, analgésica e anti-inflamatória), demonstrando efeito medicinal através de seus constituintes bioativos isolados como fenólicos, alcalóides, saponinas, terpenos, flavonóide, sido popularmente empregada para fins terapêuticos por sua possível ação analgésica, influenciando no controle da dor associada a doenças com a osteoartrite (SILVA et al., 2017).

Nessa perspectiva, em continuidade à linha de pesquisa do Grupo de Estudo Experimental da Dor, busca-se validar o efeito analgésico da espécie *Borreria verticillata* (L.) G. Mey. no modelo de OA induzida em ratos.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Osteoartrite

A OA é a forma mais comum de doença articular alterando a qualidade de vida (REZENDE MU et al., 2013), sendo a causa mais frequente de dor musculoesquelética (COIMBRA IB et al., 2004; SALTER, 2001; JOSÉ, 2013; MAN GS; G., 2014) para as atividades de vida diária (JOSÉ, 2013) e laborativas no Brasil e no mundo (COIMBRA IB et al., 2004), se tornando um problema de saúde com implicações socioeconômicas (SALTER, 2001).

A OA não possui cura e tem apresentado um impacto direto na economia em decorrência dos elevados gastos públicos com medicamentos e cuidados hospitalares; perda da produtividade por afastamento do trabalho e elevado índice de cirurgias de artroplastia de joelho (OLALEKAN AU et al., 2013).

Estima-se que nos Estados Unidos, a prevalência de dor crônica seja de 30%, (GILRON, JENSEN, DICHENSON, 2013). No Brasil, estudos realizados em Salvador e Maranhão, encontraram prevalências de 41,4% e 42% respectivamente (VIEIRA et al., 2012).

A OA é uma das doenças que mais causam dor musculoesquelética frequente e persistente, podendo atingir um a cada cinco indivíduos, principalmente idosos, causando dor crônica e incapacidade articular, tendo os joelhos como a articulação mais afetada (CUNHA-MIRANDA L, 2015), pois além de dor e fraqueza muscular, evolui com redução do equilíbrio, déficits de propriocepção, redução da amplitude de movimento e instabilidade articular (GUR H et al., 2002; KIERKEGAARD S et al., 2015; EDMONDS DW et al., 2016).

A Dor na AO, por não ser bem compreendida, devido à sua complexidade de na definição, tem sido estudada a partir de uma estrutura biopsicossocial (HUNTER DJ et al., 2008) que envolve além da perda da função articular, (ZHANG R-X et al., 2013) uma integração multifatorial de processos biológicos, cognitivos, psicológicos, sociais, emocionais e afetivos através de mecanismos periféricos e centrais do

sistema nervoso (DIEPPE PA;S., 2005; HUNTER DJ et al., 2008; LEE YC et al., 2011) pois é uma experiência multidimensional (DA SILVA JA;RIBEIRO-FILHO, 2011).

Do ponto de vista estrutural e biomecânico, a OA é caracterizada pela progressiva degeneração da cartilagem, entretanto, a relação entre a dor nas articulações e a degradação da cartilagem é pouco compreendida (OKAMOTO M;Y., 2010).

A inflamação pode causar estímulos mecânicos nocivos através da presença de fibras nervosas aferentes na cápsula articular, sinóvia, periósteo, osso subcondral, ligamentos, músculos e tendões, pois são ricamente innervados por fibras nociceptivas e podem ser a provável fonte de nocicepção (FELSON DT, 2005; HUNTER DJ et al., 2013).

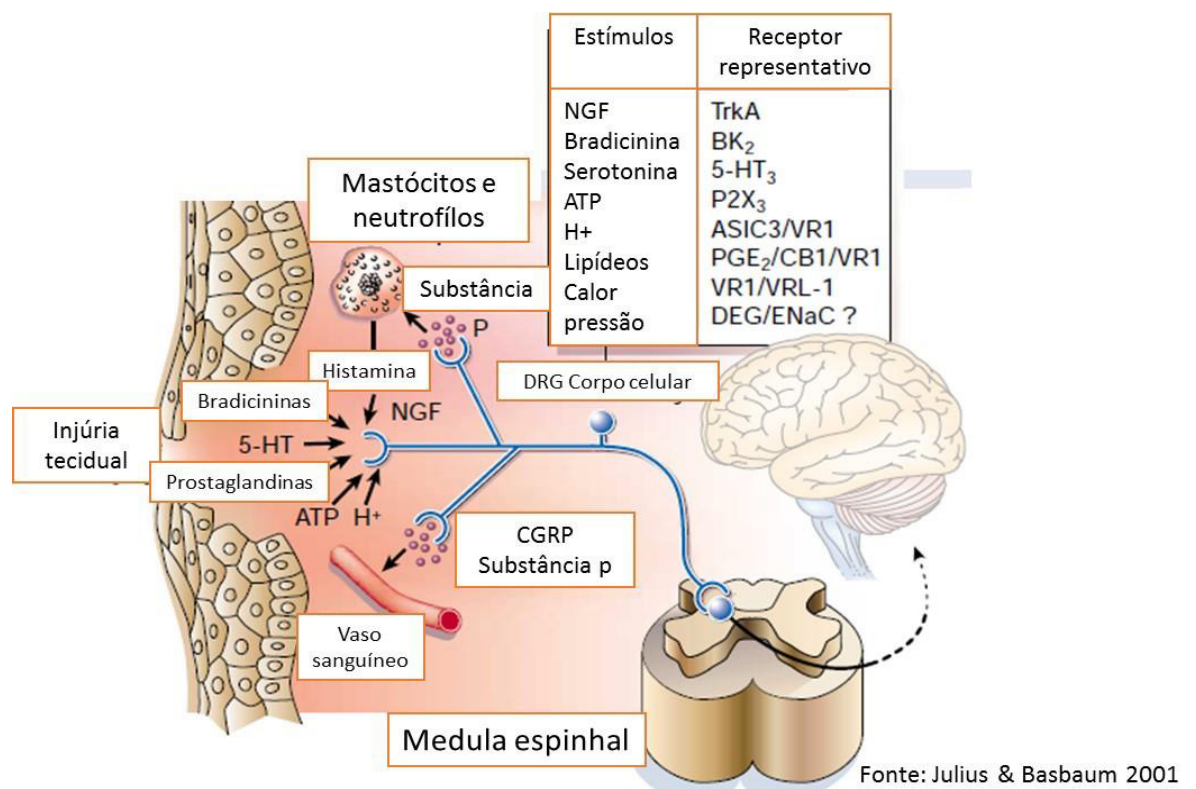


Figura 1 Via ascendente da dor

A partir de um estímulo nociceptivo, que ativa ou sensibiliza os nociceptores, gerando um potencial de ação que se transmite pelo neurônio periférico até a medula

espinhal, onde o sinal é transferido para o segundo neurônio e a seguir para regiões superiores do sistema nervoso central, gerando um potencial de dor (figura 1) (REZENDE; CAMPOS, 2013)

Um processo inflamatório envolve mediadores inflamatórios e/ou provoca uma lesão que ativa ou sensibiliza os nociceptores locais. Diferentes mediadores nociceptivos como a endotelina, substância P, prostaglandinas e aminas simpatomiméticas sensibilizam diretamente os nociceptores (figura 1) (YU et al., 2013)

As alterações fisiopatológicas que ocorrem na OA, a modificação tanto na estrutura quanto na função do osso subcondral inicia-se precocemente, implicando indiretamente em prejuízos para a cartilagem adjacente. Outro fator importante é que os condrócitos, assim como os osteoblastos e os osteoclastos, têm receptores sensíveis ao cálcio e participam de mecanismos físico-químicos semelhantes (TAT et al., 2010; TAT et al., 2011; YU et al., 2013).

Entre os mediadores pró-inflamatórios destacam-se o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), a interleucina-1 (IL-1) e a interleucina-6 (IL-6), que possuem um papel essencial no desenvolvimento da dor na OA, assim como em outros eventos inflamatórios (REZENDE et al, 2013).

A primeira citocina liberada após uma lesão tecidual é o TNF- α , que desencadeia a liberação de IL-1 β e IL-6, citocinas responsáveis pela estimulação da síntese de prostaglandinas e liberação de aminas simpáticas. Estas citocinas têm efeito catabólico e levam à destruição da cartilagem articular, pela indução da liberação de enzimas líticas, zinco-dependentes, conhecidas como metaloproteinases (colagenase, gelatinase, estromelisinase), além da diminuição de produção de agentes inibitórios teciduais das metaloproteinases e dos inibidores do plasminogênio (FITZGERALD et al, 2006).

A IL-1 β e o TNF- α inibem a síntese de componentes da matriz extracelular, sendo que a IL-1 β suprime a síntese dos colágenos II e IX, que são constituintes próprios da cartilagem, além de aumentar a produção dos colágenos I e III, o que resulta em reparação tecidual deficiente (BERENBAUM, 2013).

Avanços no entendimento da fisiopatologia da OA têm permitido um aumento considerável nos alvos terapêuticos e algumas medicações têm sido associadas à diminuição da progressão das lesões cartilaginosas, com redução da remodelação óssea subcondral (BERENBAUM, 2013).

A OA acomete principalmente as articulações dos joelhos, quadris, mãos e coluna vertebral e as principais manifestações clínicas são dor e rigidez. A estrutura e a fisiologia da cartilagem articular do joelho, bem como, os aspectos inflamatórios do processo degenerativo tem sido alvo de estudos (REZENDE et al, 2013).

Na terapia da dor em AO, são preferencialmente utilizados os anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) e os opióides. Os AINES agem bloqueando a ciclooxigenase (COX), consequentemente inibindo a síntese de prostaglandinas. Dessa forma, previnem a sensibilização de nociceptores e, consequentemente, bloqueiam a hiperalgesia inflamatórias. Os opióides, que são potentes analgésicos de ação central e também periférica, além de produzir sedação e hipnose, com tendência a produzir dependência e tolerância, também agem nos mecanismos inibitórios descendentes, inibindo diretamente os terminais nociceptivos ou as sinapses nociceptivas espinhais (YU et al., 2013).

Além desses, vários outros fármacos são utilizados como analgésicos, para tratar dor, que respondem mal aos fármacos analgésicos tradicionais. Dentre eles, estão os antidepressivos tricíclicos, antiepiléticos e anestésicos (PELLETIER, 2004)

Assim, algumas medicações têm sido associadas à diminuição da progressão das lesões cartilaginosas, com redução da remodelação óssea subcondral. Tais medicações, denominadas como drogas modificadoras da doença osteoartrite (DMDOA), apresentam propriedade de reverter, estabilizar ou pelo menos retardar o curso da doença OA. (PELLETIER, 2004)

A dificuldade de realização de estudos em humanos por razões técnicas ou éticas, levou à necessidade do desenvolvimento de modelos experimentais de artrites que apresentem semelhança com a fisiopatologia da doença humana. Em modelos experimentais com animais, podem-se traçar protocolos para avaliar de forma paralela, as alterações químicas e histológicas, observadas na doença, levando a

possibilidades de realizar manipulações experimentais para testar novos medicamentos ou procedimentos, com controle maior das variáveis envolvidas, como exclusão do placebo, homogeneidade do grupo entre outros (SILVA, 2009).

3.2 Uso de plantas medicinais

A Organização Mundial da Saúde (OMS) reconhece que as plantas medicinais são importantes instrumentos da assistência farmacêutica, e expressa sua necessidade através de ações normativas do Governo Federal. (NASCIMENTO et al., 2016)

O uso sustentável da biodiversidade, ocasionou a adoção de várias medidas e a preservação do conhecimento tradicional, assim como o incentivo à pesquisa e desenvolvimento tecnológico na área (NASCIMENTO et al., 2016).

No Brasil, a utilização de plantas medicinais tem um papel importante nos cuidados primários de saúde, principalmente nas comunidades de difícil acesso a medicamentos. A criação da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF) vem para reforçar o uso racional e seguro da fitoterapia no Brasil, que busca objetivar a ampliação das opções terapêuticas e melhorias da atenção à saúde aos usuários do SUS. (AMERI et al, 2015)

Em 2017, a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC), instituída pela Portaria nº 971 GM/MS de 3 de maio de 2006, promoveu o aumento no número de terapias alternativas no SUS incluindo a arteterapia, ayurveda, dança circular, meditação, musicoterapia, naturopatia, osteopatia, quiropraxia, reflexoterapia, reiki, shantala, terapia comunitária integrativa e yoga. (BRASIL, 2017a).

É importante salientar que a implantação dessas práticas integrativas, promove prevenção e cura de doenças, favorece o entendimento das pessoas de diferentes culturas, facilita e enriquece diversos espaços de relação interpessoais e fortalece a criação de uma identidade própria. (BRASIL, 2017a).

Estudo demonstra que 80% da população mundial que utiliza produtos à base de plantas medicinais nos seus cuidados com a saúde, buscam essa alternativa por estarem distantes dos centros de saúde ou por não possuírem condições financeira, para adquirir os medicamentos prescritos (VEIGA JÚNIOR, 2012).

O uso de plantas medicinais e da fitoterapia, demanda uma necessidade de mais estudos para substanciar seu uso correto, recomendando o desenvolvimento de protocolos para avaliar a eficácia e segurança das plantas medicinais e dos fitoterápicos. (AMERI et al., 2015).

3.3 *Borreria verticillata* (L.) G. Mey.

A família Rubiaceae compreende uma das maiores famílias de angiospermas. No Brasil, esta família inclui cerca de 130 gêneros e 1500 espécies, sendo atualmente classificada em três subfamílias e mais de 43 tribos. O gênero *Borreria* compreende cerca de 250-300 espécies distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais. (CONSERVA; FERREIRA, 2012).



Fonte: Jardim da UFMA, 2016

Figura 2. Espécie vegetal *Borreria verticillata* (L.) G. Mey

No Brasil a espécie vegetal *Borreria verticillata* (L.) G. Mey. (Figura 2) é popularmente conhecida como vassourinha de botão, poaia, poaia preta, poaia miúda e cordão-de-frade (FERREIRA JÚNIOR, et al, 2012). Tem sido usada como remédio para tratar diabetes, emese, dermatoses, reumatismos, infecções e como antipirético e analgésico (VIEIRA et al., 1999; PEREIRA et al., 2005; FERREIRA; ROSA, 2009).

Trabalhos demonstraram que *Borreria verticillata* (L.) G. Mey. apresentou atividade biológica antimalárica frente *Plasmodium falciparum* (DETHER; ERANDE; RANJAN, 2013); atividade anti-inflamatória, analgésica periférica e central (ABUDULLAHI-GERO et al., 2014a); antioxidante (ABUDULLAHI-GERO et al., 2014b) e hepatoprotetora (MURTALA et al., 2015; SILVA, et al., 2017).

Segundo Neto et al (2002), o extrato metanólico das raízes de *Borreria verticillata* (L.) G. Mey. apresentou atividade biológica contra 6 diferentes tipos de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* com zona de inibição entre 10-18mm. A atividade antibacteriana contra *Sarcinalutea* (MIC 3.0 µg/mL), *Vibrio cholerae* (MIC 12.5 µg/mL) e *Staphylococcus aureus* (MIC 100 µg/mL) foi atribuído ao alcalóide borreverina, (MAYNART et al., 1980).

Na identificação da *Borreria verticillata* (L.) G. Mey, foram encontrados alcaloides: borrarina, borreverina, isoborrevina (POUSSET et al., 1973; BALDÉ et al., 1991), emetina, espermacoceína (BALDÉ et al., 1991) deacetil-asperulosídeo, ácido deacetil-asperulosídico, metil-deacetil-asperulosídeo (SAINTY et al., 1981); no extrato metanólico das raízes os alcaloides indólicos verticilatina A e verticilatina B e o irridóide 6-O-acetilescandosídeo (VIEIRA et al 1999), no extrato metanólico das flores os irridóides, borrarriagenina, asperulosídeo e dafilosídeo. (MOREIRA et al. 2010) os terpenos campesterol, β -sitosterol, estigmasterol (DELAVEAU; JACQUEMIN, 1976), guaiaeno (BENJAMIN, 1980), e ácido asperulosódico (BEVER et al., 1983; OGUNWANDE et al. 2010).

O composto metil-deacetil-asperulosídeo, possui efeitos anti-inflamatórios via fator nuclear kappa β (NF- κ B) e proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPK) inibindo significativamente os níveis de TNF- α , IL-1 β e IL-6 in vitro e in vivo, o edema pulmonar e atividade da mieloperoxidase (MPO) (QIU et al., 2016). Além disso, terpenos como o cariofileno apresentam atividade anti-inflamatória por interferir na

migração de neutrófilos, reduz a produção de TNF- α , a expressão de COX-2, iNOS e IL-1 β e atividade analgésica por ser agonista dos receptores canabinóides (CB2) (FERNANDES et al., 2007; PAULA-FREIRE et al., 2014).

3. MODELOS EXPERIMENTAIS

Modelos animais de OA estão sendo desenvolvidos para melhorar nossa compreensão dos mecanismos da dor relacionados à OA e definir novos alvos farmacológicos para a terapia (PITCHER et al., 2016)

De forma geral, os modelos experimentais para estudo de osteoartrite podem ser classificados em: espontâneos, cirúrgicos, genéticos e químicos, cada qual englobando aspectos únicos da osteoartrite de forma simples ou combinada, mas nunca em toda a complexidade da osteoartrite humana (AMEYE e YOUNG, 2006).

Os modelos experimentais espontâneos de osteoartrite ocorrem naturalmente em algumas espécies animais, mas podem ser feitos também através da criação de modelos transgênicos, introduzindo mutações no colágeno tipo II (SAAMANEN et al., 2000). Por terem evolução progressiva e não envolverem interferência na articulação, eles expressam as modificações mais semelhantes à osteoartrite humana.

No entanto, as alterações articulares têm evolução bastante lenta, o que acaba prolongando o tempo de estudo da patogênese da doença e dos efeitos de drogas testadas (BENDELE et al., 1991; THIAGO, 2018).

Os modelos cirúrgicos também são bastante utilizados por terem resultados previsíveis e de rápida instalação. Estes podem se dar por meio de lesões cirúrgicas que produzem instabilidade na própria articulação como menissectomia (UCHII et al., 2010), lesões através da ressecção do ligamento cruzado anterior (TEEPLE et al., 2011), combinação de ambas as lesões na mesma articulação (FERLAND et al., 2011) ou lesões diretas na própria cartilagem (THOMPSON et al., 1991).

Como uma das articulações mais usadas nestes modelos é o joelho, um dos obstáculos para análise dos resultados é a distribuição da carga articular. Como

demonstrado por BENDELE e HULMAN (1988) animais que distribuem seu peso, predominantemente, sobre a porção medial da cartilagem articular do joelho, terão lesões mais severas nessa localização, após uma meniscectomia medial e vice-versa. (CAKE et al., 2005).

Assim como os modelos cirúrgicos, os modelos experimentais químicos de osteoartrite também apresentam resultados de rápida instalação. A osteoartrite durante muito tempo, foi induzida por substâncias químicas de maneira sistêmica como no uso do adjuvante de Freund, aplicado por via intradérmica na cauda do rato (AWOUTERS et al., 1976) ou na planta do membro pélvico (STEIN, MILLAN e HERT, 1988).

Entretanto, esse quadro sistêmico, além de levar à poliartrite generalizada, está associado à piora do estado geral do animal dificultando seu manuseio por muito tempo. Por causarem alterações por vezes bastante agressivas, são modelos ideais para o estudo de osteoartrite secundária, que possui uma evolução bem mais acelerada que a osteoartrite primária de evolução progressiva e lenta. Há também outras substâncias utilizadas com este propósito como a collagenase (LEE et al., 2009), quinolona (BENDELE, 2001) e papaína (NEUGEBAUER et al., 2007).

Atualmente, um dos modelos químicos de osteoartrite mais utilizados é o monoiodoacetato de sódio (MIA), um inibidor de atividade da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase e da glicólise que induz à morte dos condrócitos. A injeção intra-articular de MIA leva à destruição de condrócitos em roedores e não roedores. Quando usado em roedores, o modelo apresenta lesões da cartilagem com perda matriz proteoglicana e alterações da função, com rigidez articular similares às aquelas observadas na osteoartrite humana (SCHUELERT e MCDOUGALL, 2009).

Na cartilagem articular, a necrose dos condrócitos leva à destruição desta com erosão e exposição do osso subcondral que, em uma fase mais avançada da doença, irá responder com remodelação óssea, esclerose e formação osteofítica (GUZMAN et al., 2003). Este modelo de lesão de artrite por monoiodoacetato de sódio foi descrito por Kalbhen há 30 anos (COMBE, BRAMWELL e FIELD, 2004, PITCHER et al., 2016).

Ainda estudando o modelo de osteoartrite induzida por MIA, alguns trabalhos surgiram avaliando o comportamento doloroso dos animais (PITCHER et al 2016), o modelo experimental escolhido para este estudo, além da Dor, avaliará parâmetros como: avaliação de atividade motora/deambulação forçada (RotaRod Test) (MONVILLE;et al, 2006); quantificação de dor espontânea e avaliação da alodinia mecânica (Von Frey Test) (SILVA, 2009); teste de incapacidade/ distribuição do peso nas patas traseiras (Weight Bearing); (SCOTT et al., 1994); hiperalgesia mecânica (Randall Selitto Test) (RANDALL, SELITTO, 1957; NOGUEIRA et al, 2012).

4. OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar os efeitos analgésicos de *Borreria verticillata* (L.) G. Mey. em modelo experimental de osteoartrite em joelhos de ratos.

2.2 Específicos

- ✓ Avaliar os efeitos da *Borreria verticillata* (L.) G. Mey. na alodinia mecânica e hiperalgesia primária através de testes comportamentais clínicos;
- ✓ Avaliar o grau de incapacitância articular, através de parâmetros comportamentais clínicos;
- ✓ Verificar o efeito de *Borreria verticillata* (L.) G. Mey. sobre as alterações radiológicas articulares.

REFERÊNCIAS

ABDULLAHI-GERO, et al., Evaluation of Antioxidant Activity of Leave Extract of *Borreria verticillata* Linn (Rubiaceae). Journal of Natural Sciences Research., v. 9, p. 25-30, 2014b.

ABDULLAHI-GERO, et al., Preliminary evaluation of ethanol leaf extract of *Borreria verticillata* Linn (Rubiaceae) for analgesic and anti- inflammatory effects. Journal of Medicinal Plant research, v.8, n.20, p. 736-747, 2014a.

AMERI, A.Z. et al. Toxicity study about a medicinal plant Casearia sylvestris: a contribution to the Brazilian Unified Health System (SUS). Journal of Ethnopharmacol. v.175, n.4, p.9-13, 2015.

AMEYE, L. G.; YOUNG, M. F. Animal models of osteoarthritis: lessons learned while seeking the 'Holy Grail'. Current Opinion in Rheumatology, v. 18, n. 5, p. 537-547, 2006.

AWOUTERS, F.; DE PROOST, L. M.; LENAERTS, F. M.; LENAERTS, P. M.; NIEMEGEREERS, C. J. A new apparatus for measuring diameter changes of the rat paw and tibiotarsal joint. Arzneimittel Forschung, v. 26, n. 1, p. 37-40, 1976.

BALDÉ, A. M. et al. Spermacoceine, Bis-indole alkaloide form *Borreria verticillata*. Phytochemistry, v. 30, n. 3, p. 997-10001, 1991.

BENDELE, A. M. Animal models of osteoarthritis. Journal of Musculoskeletal and Neuronal Interactions, v.1, n. 4, p. 363-376, 2001.

BENDELE, A. M.; HULMAN, J. F. Spontaneous cartilage degeneration in guinea pigs. Arthritis & Rheumatology, v. 31, n. 4, p. 561-565, 1988.

BENDELE, A. M.; WHITE, S. L.; HULMAN, J. F.; BEAN, J. S. Osteoarthritis, model no 379. In: CAPEN, C. C.; JONES, T. C.; MIGAKI, G. (Eds.). Handbook: animal models of human disease. Washington, DC, 1991. Fasc. 18.

BENJAMIN TV. Analysis of the volatile constituents of local plants used for skin disease. J Afr Med Pl., v. 3, p. 135-9, 1980.

BENJAMIN, T.V. Investigation of *Borreria verticillata*, an antieczematic plant of Nigeria. Quarterly Journal Of Crude Drug Research, v. 17, p. 135-6, 1979.

BERENBAUM F. Osteoarthritis as an inflammatory disease (osteoarthritis is not osteoarthrosis!). Osteoarthritis And Cartilage 2013; 21:16-21. <http://dx.doi.org/10.1016/j.joca.2012.11.012>.

BEVER, B. O. Medicinal Plants in Tropical West Africa II.Plants acting on the nervous system.Journal og Ethopharmacology. v.7, n. 1, p. 1-93, 1983.

BIJLSMA JW, BERENBAUM F, LAFEBER FP. Osteoarthritis: an update with relevance for clinical practice. The Lancet 2011; 377:2115-2126. [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(11\)60243-2](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(11)60243-2).

BRASIL. Formulário de fitoterápicos da farmacopeia brasileira. Brasília, DF, 126f. 2011a. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/hotsite/farmacopeiabrasileira/conteudo/Formulario_de_Fitoterapicos_da_Farmacopeia_Brasileira.pdf>. Acesso em: 18 out. 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2006a. Portaria ANVISA-MS nº 971, de 03 de maio de 2006. Aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde. DOU, 2006a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2006b. Decreto nº 5813 de 22 de junho de 2006. Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá outras providências. DOU, 2006b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Práticas integrativas e complementares: plantas medicinais e fitoterapia na Atenção Básica/Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. – Brasília : Ministério da Saúde, n. 31, 156 p., 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. Relação Nacional de Medicamentos Essenciais: RENAME 2017 / Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. – Brasília: Ministério da Saúde, 2017. 210 p.

BRASIL. Presidência da República. Decreto nº 5.813, de 22 de junho de 2006. Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá outras providências. Brasília, DF, Diário Oficial da União, 23 jun. 2006b. Disponível em: <www.saude.gov.br>. Acesso em: 27 fev.2017

CAKE, M. A.; et al., Ovariectomy alters the structural and biomechanical properties of ovine femoro-tibial articular cartilage and increases cartilage iNOS. *Osteoarthritis and Cartilage*, v. 13, n. 12, p. 1066-75, 2005.

CLEGG, DO et al., Glucosamine, Chondroitin Sulfate, and the Two in Combination for Painful Knee Osteoarthritis. *New England Journal Of Medicine* 2006; 354:795-808. <http://dx.doi.org/10.1056/nejmoa052771>

COIMBRA IB; PASTOR EH; GREVE JMD; PUCCINELLI MLC; FULLER R; CAVALCANTI FS; MACIEL FMB; H. E. osteoartrite (artrose): tratamento. *REv Bras Reumatol*, v. 44, n. 6, p. 450-453, 2004.

COMBE, R.; BRAMWELL, S.; FIELD, M. J. The monosodium iodoacetate model of osteoarthritis: a model of chronic nociceptive pain in rats? *Neuroscience Letters*, v. 370, n. 2, p. 236-240, 2004.

CONSERVA, L.M.; FERREIRA, J.J.C. *Borreria* and *Spermacoce* species (Rubiaceae): A review of their ethnomedicinal properties, chemical constituents, and biological activities. *Pharmacognosy Reviews*, v.6, n. 11, p. 46-55, 2012.

CUNHA-MIRANDA L, F. A., ALVES C, VCENTE V, BARBOSA S,. Avaliação da magnitude da desvantagem da osteoartrite na vida das pessoas: estudo MOVES. *REV. BRAS. REUMATOL*, v. 55, n. 1, p. 22-30, 2015.

DA SILVA JA; N. RIBEIRO-FILHO. A dor como um problema psicofísico. Rev Dor, v. 12, n. 2, p. 138-151, 2011.

DELAVEAU, A. R.; JACQUEMIN, H. Phytochemical Research On Several Madagascan Rubiaceae plant. Phytochemistry, v.31, n. 1, p. 163-166, 1976.

DETHER, D.H.; ERANDE, R.D.; RANJAN, A. Biomimetic total syntheses of borreverine and flinderole alkaloids. . The Journal of Organic Chemistry, v.78, n. 20, p. 10106-20, out. 2013.

DIEPPE PA; L. L. S. Pathogenesis and management of pain in osteoarthritis. The Lancet, v. 365, n. 9463, p. 965-973, 2005.

DUTRA R.C. et al. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. Pharmacological Research, v.23, 2016

EDMONDS DW; MCCONNELL J; EBERT JR; ACKLAND TR; D. CJ. Biomechanical neuromuscular and knee pain effects following therapeutic knee taping among patients with knee osteoarthritis during walking gait. Clinical Biomechanics, v. 39, p. 28-43, 2016.

FELSON, D.T.. Osteoarthritis as a disease of mechanics. Osteoarthritis Cartilage. 21, 10-15. Berenbaum, F. (2013). Osteoarthritis as an inflammatory disease (osteoarthritis is not osteoarthrosis!). Osteoarthritis Cartilage. 21, 16-21, 2013

FERLAND, C. E, et al., Gait analysis and pain response of two rodent models of osteoarthritis. Pharmacology Biochemistry and Behavior, v.97, n. 3, p. 603-610, 2011.

FERNANDES, E.S. et al.. Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (-)-trans-caryophyllene isolated from the essential oil of Cordia verbenacea. Eur Journal of Pharmacology, v.569, n. 3, p. 228-36, 2007.

FERREIRA JÚNIOR, J.C.; P, R. P. L.; CONSERVA, L. M. Chemical constituents from *Spermocoe verticillata* (rubiaceae). Biochemical Systematics and Ecology, v. 44, p. 208-11, 2012.

FERREIRA, A. G; ROSA, S. G. T. Germinação de sementes de sete espécies medicinais naivas do sul do Brasil. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, v.11, n.3, p. 230-235, 2009.

FIDELIX TS, et al., Diacerein for osteoarthritis. *Cochrane Database Systematic Reviews*; 2014, CD005117. <http://dx.doi.org/10.1002/14651858.CD005117.pub3>.

FITZGERALD JB, JIN M, GRODZINSKY AJ. Shear and Compression Differentially Regulate Clusters of Functionally Related Temporal Transcription Patterns in Cartilage Tissue. *Journal Of Biological Chemistry*, 2006

GILRON I.; JENSEN T.S.; DICKENSON A.H. Combination pharmacotherapy for management of chronic pain: from bench to bedside. *Lancet Neurol*, v. 12, n. 11, 2013.

GUZMAN, R. E.; et al., Mono-iodoacetate-induced histologic changes in subchondral bone and articular cartilage of femorotibial joints: an animal model of osteoarthritis. *Toxicologic Pathology*, v. 31, n. 6, p. 619-624, 2003.

HOCHBERG MC, ZHAN M, LANGENBERG P. The rate of decline of joint space width in patients with osteoarthritis of the knee: a systematic review and meta-analysis of randomized placebo-controlled trials of chondroitin sulfate. *Current Medical Research And Opinion* 2008; 24:3029-3035. <http://dx.doi.org/10.1185/03007990802434932>

HUNTER DJ; MCDOUGALL JJ; K. FJ. The Symptoms of osteoarthritis and the genesis of pain. *Rheumatic Disease Clinics of North America*, v. 34, n. 3, p. 623-643, 2008.

KIERKEGAARD S; JORGENSEN PB; DALGAS U; SOBALLE K; M. I. Pelvic movement strategies and leg extension power in patients with end-stage medial compartment knee osteoarthritis: a cross-sectional study. *Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery*, v. 135, p. 1217-1226, 2015.

KUCHARZ, EJ, et al., A review of glucosamine for knee osteoarthritis: why patented crystalline glucosamine sulfate should be differentiated from other

glucosamines to maximize clinical outcomes. *Current Medical Research and Opinion* 2016; 32:997-1004. <http://dx.doi.org/10.1185/03007995.2016.1154521>

LAPA, A. J. Métodos de Avaliação da Atividade Farmacológica de Plantas Medicinais. Cytel, 2002.

LEE, C. H.; et al., Intra-articular magnesium sulfate (MgSO₄) reduces experimental osteoarthritis and nociception: association with attenuation of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor subunit 1 phosphorylation and apoptosis in rat chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage*, v. 17, n. 11, p. 1485-1493, 2009.

LIM SH; HONG BY; OH JH; L. JI. Relationship between knee alignment and the electromyographic activity of quadriceps muscles in patients with knee osteoarthritis. *Journal of Physical Therapy Science*, v. 27, p. 1261-1265, 2015.

MAN GS; M. G. Osteoarthritis pathogenesis - a complex process that involves the entire joint. *Journal of Medicine and Life*, v. 7, n. 1, p. 37-41, 2014.

MAYNART, G. et al. Antibacterial effect of borreverine, an alkaloid isolated from *Borreria verticillata* (Rubiaceae). *Soc. Biol. Fil.*, v.174, n.5, p. 925-8, 1980.

MOREIRA, D. L., et al., Traditional use and safety of herbal medicines. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, Curitiba , v. 24, n. 2, p. 248-257, 2014 .

MOREIRA, V. F. et al New Chemical Constituents from *Borreria verticillata* Mey (Rubiaceae). *Helvetica Chimica Acta*, n. 93, n.9, p. 1751–1757, 2010.

MURTALA, Y. et al. Effect of Aqueous Leaf Extract of *Borreria verticillata* of Sudano- Sahelian Savanna on CCl₄ induced hepatotoxicity. *Journal of Natural Sciences Research*, v.24, p.67-72, 2015.

NASCIMENTO JÚNIOR BJ, et al., Avaliação do conhecimento e percepção dos profissionais da estratégia de saúde da família sobre o uso de plantas medicinais e fitoterapia em Petrolina-PE, Brasil. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, 18: 57-66; 2016.

NETO, P. A. P. S et al. Antibacterial activity of *Borreria verticillata* roots. Fitoterapia., n. 73, v. 6, p. 529-531, 2002.

NEUGEBAUER, V.; HAN, J. S.; ADWANIKAR, H.; FU, Y.; JI, G. Techniques for assessing knee joint pain in arthritis. Molecular Pain, v. 3, n. 8, p. 1-13, 2007.

OGUNWANDE, I. A. et al. Essential oil constituents and biological activities of *Peristrophe bicalyculata* and *Borreria verticillata*. Natural product communications, v. 5, n. 11, p. 1815-8, 2010.

OKAMOTO M; A. Y. Cartilage degeneration is associated with augmented chemically-induced joint pain in rats: A pilot study. Clin Orthop Relat Res, v. 468, p. 1423-1427, 2010.

OLALEKAN AU; WINDT DAV; JORDAN JL; DZIEDZIC KS; HEALEY EL; PEAT GM; F. NE. Exercice for lower limb osteoarthritis: systematic review incorporating trial sequential analysis and network meta-analysis. British Medical Journal, v. 20, 2013.

PAULA-FREIRE, L. et al. The oral administration of trans-caryophyllene attenuates acute and chronic pain in mice. Phytomedicine., v.. 21, n 3, p. 356-62, 2014.

PELLETIER, J-P. Pathophysiology of osteoarthritis. Osteoarthritis and Cartilage, v. 12, p. 31-33, 2004.

PEREIRA, C. O. et al. Abordagem etnobotânica de plantas medicinais utilizadas em dermatologia na cidade de João Pessoa- Paraíba, Brasil. Revista Brasileira de Plantas Medicinais., v. 7, n. 3, p. 9-71, 2005.

PITCHER, T., SOUSA-VALENTE, J., & MALCANGIO, M. "The Monoiodoacetate Model of Osteoarthritis Pain in the Mouse" Journal of visualized experiments: JoVE, 111 53746. 16 May. 2016, doi:10.3791/53746

REZENDE MU, CAMPOS GC, PAILO AF. Conceitos atuais em osteoartrite. Acta Ortopetica Brasileira 2013; 21:120-122. <http://dx.doi.org/10.1590/s1413-78522013000200010>

RODRIGUES, THIAGO A et al., Prophylactic and Therapeutic Use of Strontium Ranelate Reduces the Progression of Experimental Osteoarthritis Frontiers in pharmacology vol. 9 975. 19 Sep. 2018, doi:10.3389/fphar.2018.00975

ROSA C; M. CA. Plantas medicinais utilizadas no tratamento de doenças reumáticas: revisão. Rev. Bras. Farm, v. 88, n. 1, p. 26-32, 2007.

SAAMANEN, A. M.; et al., Osteoarthritis-like lesions in transgenic mice harboring a small deletion mutation in the type II collagen gene. Osteoarthritis and Cartilage, v. 8, n. 4, p. 248-257, 2000.

SAINTY, D. et al. Iridoids of *Borreria verticillata*. Planta Medcal., v. 42, p. 260-4, 1981.

SALTER, R. B. Distúrbios e lesões do sistema musculoesquelético. 3. ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2001. 699p.

SCHUELERT, N.; MCDUGALL, J. J. Grading of monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis reveals a concentration-dependent sensitization of nociceptors in the knee joint of the rat. Neuroscience Letters, v. 465, n. 2, p. 184-188, 2009.

SILVA RHM, et al, Antinociceptive Activity of *Borreria verticillata*: In vivo and In silico Studies. Front Pharmacol. 2017.

SILVA, L.E. et al. Hydrotherapy Versus Conventional Land-Based Exercise for the Management of Patients With Osteoarthritis of the Knee: A Randomized Clinical Trial. Physical Therapy, v. 88, n. 1, p. 12-21, 2008.

STEIN, C.; MILLAN, M. J.; HERZ, A. Unilateral inflammation of the hindpaw in ratsasa model of prolonged noxious stimulation: alterations in behavior and nociceptive thresholds. Pharmacology Biochemistry and Behavior, v. 31, n. 2, p.455-51, 1988.

TAT SK, et al., Strontium ranelate inhibits key factors affecting bone remodeling in human osteoarthritic subchondral bone osteoblasts. Bone 2011; 49:559-567. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bone.2011.06.005>.

TAT, SK, et al., Targeting subchondral bone for treating osteoarthritis: what is the evidence? *Best Practice and Research Clinical Rheumatology* 2010; 24:51-70. <http://dx.doi.org/10.1016/j.berh.2009.08.004>.

TEEPLE, E.; et al., The Effects of Supplemental Intra-Articular Lubricin and Hyaluronic Acid on the Progression of Post-Traumatic Arthritis in the Anterior Cruciate Ligament Deficient Rat Knee. *The American Journal of Sports Medicine*, v. 39, n. 1, p.164-172, 2011.

THOMPSON JUNIOR, R. C., et al., Osteoarthrotic changes after acute transarticular load - An animal model. *The Journal of Bone & Joint Surgery*, v. 73, n.7, p. 990-1001, 1991.

TORRES L; FARIAS J; LIMA T; SOUZA FB; RAMALHO J; MORAIS L; D. MFFM. Tratamento da Osteoartrose Experimental em Joelhos de Ratos com Extrato Hidroalcoólico do *Cisampelos Sympodialis Eichl.* *Revista Brasileira de Ciências da Saúde*, v. 13, n. 1, p. 26-32, 2009.

UCHII, M.; et al., Role of fibroblast growth factor 8 (FGF8) in animal models of osteoarthritis. *Arthritis Research & Therapy*, v. 10, n. 4, p. 1-10, 2010.

UR H; CAKIN N; ANOVA B; O. E. K. S. Concentric versus combined concentric-eccentric isokinetic training: effects on functional capacity and symptoms in patients with osteoarthrosis of the knee. *Archives of Physical and Medicine Rehabilitation* v. 83, p. 308-316, 2002.

VARADY NH, GRODZINSKY AJ. Osteoarthritis year in review 2015: mechanics. *Osteoarthritis And Cartilage* 2016; 24:27-35. <http://dx.doi.org/10.1016/j.joca.2015.08.018>.

VEIGA JÚNIOR VF. Estudo do consumo de plantas medicinais na Região Centro-Norte do Estado do Rio de Janeiro: aceitação pelos profissionais de saúde e modo de uso pela população. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 18: 308-313; 2008.

VIEIRA, I. J. C. et al. Iridoids from *Borreria verticillata*. Organic Letter, v.1 n. 8, p.1169-1171, 1999.

VIEIRA, M. E. B et al. Prevalence, characteristics, and factors associated with chronic pain with and without neuropathic characteristics in São Luís, Brazil. Journal of Pain and Symptom Management, v. 44, n. 2, p. 239-241, 2012.

VINCENT KR; CONRAD B; FREGLY BJ; V. HK. The Pathophysiology of osteoarthritis: a mechanical perspective on the knee joint. American academy of Physical Medicine and Rehabilitation, v. 4, n. 5, p. 1-11, 2012.

VUOLTEENAHONEN K, et al., Aurothiomalate and hydroxychloroquine inhibit nitric oxide production in chondrocytes and in human osteoarthritic cartilage. Scandinavian Journal Of Rheumatology 2005; 34:475-479 <http://dx.doi.org/10.1080/03009740510026797>.

YU, DG, et al., Strontium ranelate reduces cartilage degeneration and subchondral bone remodeling in rat osteoarthritis model. Acta Pharmacologica Sinica 2013; 34:393-402. <http://dx.doi.org/10.1038/aps.2012.167>

ZHANG R-X; REN K; D. R. Osteoarthritis pain mechanisms: basic studies in animal models. Osteoarthritis and cartilage, v. 21, p. 1308-1315, 2013.

5. ARTIGO I

Revista: Frontiers in Pharmacology

Webqualis: A1

Área: Medicina II

Justificativa de escolha: Essa revista atende aos critérios do Programa, no que se refere ao Qualis e área de conhecimento. Nosso grupo de pesquisa tem publicações na mesma e este artigo a ser submetido é continuidade do artigo já publicado pela equipe, nos levando a concluir que, a possibilidade de aceite para publicação nesta revista, é em maior chance.

Status: a ser submetida

Efeito da ação analgésica de *Borreria verticillata* (L.) G. Mey. em Ratos com Osteoartrite induzida por MIA

Marineide Sodré Rodrigues¹, João Batista S. Garcia^{#1}, Maria do Socorro de S. Cartágenes^{#1}

¹Laboratório de Estudo Experimental da Dor, Departamento de Ciências Fisiológicas. Universidade Federal do Maranhão, Av. dos Portugueses, 1966, CEP 65080-805, São Luís, MA, Brasil.

Revista: Frontiers in Pharmacology

**Efeito da ação analgésica de *Borreria verticillata* (L.) G. Mey. em
Ratos com Osteoartrite induzida por MIA**

Marineide Sodré Rodrigues¹, João Batista S. Garcia*¹, Maria do Socorro de S. Cartágenes^{#1}

¹Laboratório de Estudo Experimental da Dor, Departamento de Ciências Fisiológicas. Universidade Federal do Maranhão, Av. dos Portugueses, 1966, CEP 65080-805, São Luís, MA, Brasil.

Resumo

A dor na osteoartrite (OA) causa incapacidade e comprometimento funcional da articulação afetada, sendo seu manejo considerado um grande desafio. Na busca de novas terapias surge a *Borreria verticillata* (L.) G. Mey. (BV), popularmente conhecida como vassourinha de botão, cujas propriedades anti-inflamatórias e antinociceptivas são cientificamente comprovadas, considerada um potencial para terapia analgésica da osteoartrite. A OA não possui cura e tem apresentado um impacto direto na economia em decorrência dos elevados gastos públicos com medicamentos e cuidados hospitalares. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito terapêutico do extrato hidroetanólico bruto (EHBv) e fração acetato de etila (FAC) de BV em modelo experimental de OA em joelhos de ratos. Os animais foram distribuídos em sete grupos com 6 animais cada. Em seis grupos (Salina, Melox, EHBv, FAC 5mg, FAC 2,5mg, AU 10mg) foi induzida OA com uma única injeção intra-articular de Monoiodoacetato de sódio(MIA) no joelho direito e o sétimo grupo (sem OA), controle NAIVE. A partir do 3º dia após indução, os animais foram tratados até o 28º dia, via oral (por gavagem) com extrato e frações de BV nas seguintes doses: EHBv 500mg/kg/dia, FAC 5mg/kg/dia, FAC 2,5mg/kg/dia e AU 10mg/Kg/dia e Meloxicam 0,2mg/kg/dia, salina (0,1ml/Kg). Para avaliação clínica comportamentais utilizou-se os parâmetros: atividade motora/deambulação forçada, quantificação de dor espontânea e avaliação da alodinia mecânica; análise da incapacitância/ distribuição do peso nas patas traseiras e hiperalgesia mecânica. O estudo farmacológico atenuou significativamente as manifestações comportamentais de dor nos animais tratados com o extrato e suas frações, em comparação com o grupo salina (0,1ml/Kg) sugerindo uma ação analgésica da BV. A *Borreria verticillata* (L.) G. Mey. revela ser um composto promissor para o desenvolvimento de fármacos utilizados para analgesia no tratamento de Osteoartrite, podendo ser úteis no tratamento de diferentes tipos de dores e como adjuvantes para medicamentos convencionais.

Palavras-chaves: *Borreria verticillata*. Osteoartrite. Analgésico, Ratos Wistar

Introdução

Atualmente, os anti-inflamatórios são uma classe de medicamentos muito utilizados em diferentes tipos de patologias infecciosas ou não. Entretanto, muitos deles apresentam efeitos colaterais consideráveis, levando a diminuição da sua utilização clínica. Sendo assim, a busca por tratamentos alternativos aos tratamentos convencionais é necessária e vem sendo um grande estímulo para o desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos que possam ser utilizados em processos inflamatórios de diferentes etiologias (Appleton, 1997; Shukla et al., 2010; Rodrigues, 2012; Alves, 2017).

A dor é um problema de saúde com implicações socioeconômicas, considerada uma das principais causas de busca por atenção médica (Salter, 2014). A prevalência na população mundial é estimada entre 1,5% e 8%, aproximadamente entre 100 a 560 milhões de pessoas em todo o mundo (Alles & Smith, 2018).

Biologicamente, a lesão tecidual gera uma sensação subjetiva de dor, pois os mediadores químicos liberados na articulação pela inflamação sensibilizam os nervos aferentes primários através de estímulos nociceptivos intensos e persistentes levando a um quadro algico espontâneo e a hipersensibilidade mecânica secundária por estímulos neuronais no corno posterior da medula espinhal e/ou nos centros superiores (HUNDER DJ et al., 2008), através de uma regulação ascendente (O'NEILL S et al., 2007) até o tronco, tálamo e córtex cerebral (HUNDER DJ et al., 2008) produzindo alterações funcionais, chamadas de neuroplasticidade neural através de alterações em canais iônicos ou receptores na distribuição de neurotransmissores e neuromoduladores cerebrais (Woolf CJ;Mw., 2000; Staud R et al., 2007).

A Osteoartrite (OA) está entre as doenças Crônicas, definido pelo Colégio Americano de Reumatologia (ACR) como um grupo heterogêneo de condições que induzem sinais e sintomas articulares dolorosos associados a defeitos na integridade da cartilagem articular em associação a alterações relacionadas ao tecido ósseo situado na margem articular (Ximenes, et al 2009).

Avanços no entendimento da fisiopatologia da OA têm permitido um aumento considerável nos alvos terapêuticos e algumas medicações têm sido associadas à diminuição da progressão das lesões cartilaginosas, com redução da remodelação óssea subcondral (Kwan, et al., 2010). Estes dados também foram vistos por Rezende et al, 2013.

Considerando os fatores que colaboram para os mecanismos da dor, além do uso de plantas medicinais como alternativa terapêutica, este trabalho objetivou avaliar a atividade analgésica do extrato hidroetanólico e fração acetato de etila de *Borreria verticillata* (L.) G. Mey. em ratos com osteoartrite induzida por MIA.

Materiais e Métodos

Material Botânico

Foram utilizadas partes aéreas de *Borreria verticillata* (L.) G. Mey., coletadas na cidade de São José de Ribamar, Maranhão, localizado na Região Nordeste do Brasil, situado a 11 metros de altitude, Latitude 02° 33' 47" Sul e Longitude 44° 03' 45" Oeste; em janeiro de 2016 e catalogadas no Herbário do Maranhão (MAR) da Universidade Federal do Maranhão sob o número 5151.

Obtenção do extrato hidroetanólico (EHBv) e fração acetato de etila(FAc)

As partes aéreas de *Borreria verticillata* (L.) G. Mey. foram secas em estufa com circulação de ar a 38°C, seguida de trituração em moinho de facas, obtendo-se o pó moderadamente grosso (tamanho inferior a 710 µm e superior a 250 µm).

O pó obtido foi dividido em duas partes. A primeira parte foi macerada e remacerado com álcool etílico 70% durante cinco dias sob agitação ocasional, sendo este processo repetido três vezes, filtrado, particionado com diclorometano (1:1, v/v)

e concentrado em evaporador rotativo sob pressão reduzida a 40°C, obtendo-se o extrato hidroetanólico de *Borreria verticillata* (L.) G. Mey. (Simões et al., 2000)

A segunda parte foi macerada com etanol 95% por 72 horas, sendo este processo repetido quatro vezes. A solução extrativa resultante foi concentrada em evaporador rotativo sob pressão reduzida a 40°C. Posteriormente, foi dissolvido metanol: água (7:3 v/v) durante 60 minutos sob agitação mecânica, particionada com hexano, clorofórmio e acetato de etila (q.s.p) em ampola de separação, filtrada sob pressão reduzida com sulfato de sódio anidro (Na₂SO₄) e concentrada em evaporador rotativo para obtenção da fração acetato de etila (FAc). Estudo realizado por Silva, 2017, demonstrou por meio High-Performance Liquid Chromatography with Ultraviolet-Visible Detector (HPLC UV/Vis) e Gas Chromatography—Mass Spectrometry (GC-MS), a FAc ser a mais pura e por meio de estudo in sílico, apresentar atividade de interação com a COX e receptores NMDA, ambos relacionados com a dor.

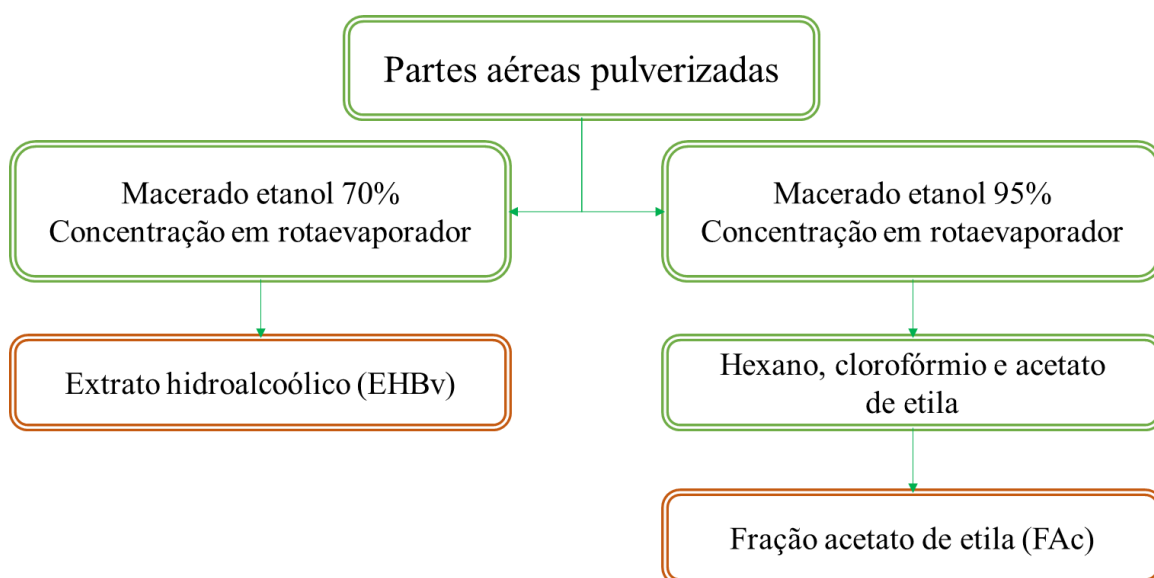


Figura 3 Fluxo de obtenção do Extrato Hidroalcoólico de *Borreria verticillata* (EHBv) e Fração de Acetato de etila (FAc)

Grupos experimentais

Após o terceiro dia da indução, 30 animais (5 grupos com N=6) foram tratados com um protocolo analgésico/ anti-inflamatório, os 12 animais restantes, foram tratados com placebo (SALINA) da seguinte forma:

O grupo (SALINA) recebeu doses de 0,1ml/Kg de NaCl 0.9%, o grupo (Meloxicam) recebeu doses de 0,2 mg/Kg de Meloxicam, o grupo (AU) recebeu doses de 10 mg/Kg de ácido ursólico, o grupo (FAC) receberam doses 2,5 mg/kg (FAC 2,5) e 5 mg/Kg (FAC 5) da fração acetado de etila de *Borreria verticillata* (L.) G. Mey., o grupo (EHBv) recebeu doses de 500 mg/Kg de extrato hidroetanólico de *Borreria verticillata* (L.) G. Mey. e o grupo (SADIO) sem indução recebeu doses de 0,1ml/Kg de NaCl 0.9%. A cada 7 dias (D7, D14, D21), a partir do dia da indução (D0), os animais passam por avaliação clínica até o 28º dia (D28).

O protocolo de tratamento foi realizado por administração diária por gavagem (via oral), em dose única, entre 9 e 10 horas por um período de 25 dias após indução.

A dose de meloxicam (0,2mg/kg) foi escolhida considerando a dose equivalente humana ($HED = 0,162 \times 0,2 \text{ mg/kg}$) (Nair & Jacob, 2016), determinada tendo em consideração os dados toxicológicos que indicam 0,2 mg/ kg como o “Nível sem efeito” no sistema gastrointestinal e nos rins (Relatório de síntese, Comité dos Medicamentos Veterinários, Agência Europeia de Avaliação dos Medicinal Products, Meloxicam,) (Nagy et al., 2017).

O Ácido Ursólico foi escolhido como controle positivo da fração acetato de etila, considerando o estudo de Silva (2017), obteve resultados através de testes in sílico, nos quais demonstraram que, dos compostos identificados na fração acetato de etila, o ácido ursólico é o principal componente ativo, apresentando interações relevantes com aminoácidos do local ativo da COX-2 e do receptor NMDA.

Estudos biológicos in vivo Animais

Foram utilizados ratos da linhagem Wistar, espécie *Rattus norvegicus*, adultos, machos com peso 200-300g obtidos do Biotério Central da Universidade Federal do Maranhão (UFMA). Os protocolos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Maranhão (UFMA) parecer nº17, sob o protocolo nº 23115013422/2016-29.

Modelo OA induzido por Monoiodo Acetato de Sódio (MIA)

Para a indução da OA, os animais foram anestesiados através de inalação de isoflurano 1%. Após a certificação do plano anestésico, foi realizada uma tricotomia no joelho direito e, posteriormente, uma solução tópica de iodopovidona a 10% foi aplicada para assepsia local. Uma lesão articular foi induzida por uma única injeção intra-articular de 2 mg de MIA (diluído em um volume máximo de 25 µL) no joelho direito através do ligamento patelar (adaptado de Fernihough, et al., 2004; Silva, Andersen e Tufik, 2008; Silva et al., 2008; Pitcher et al., 2016)

O desenho experimental foi projetado e executado em conformidade com as diretrizes da ARRIVE (Kilkenny et al., 2010). As principais fases, distribuição dos grupos, o momento das intervenções e os pontos de verificação do experimento estão resumidos em um fluxograma abaixo (Figura 4 e 5).

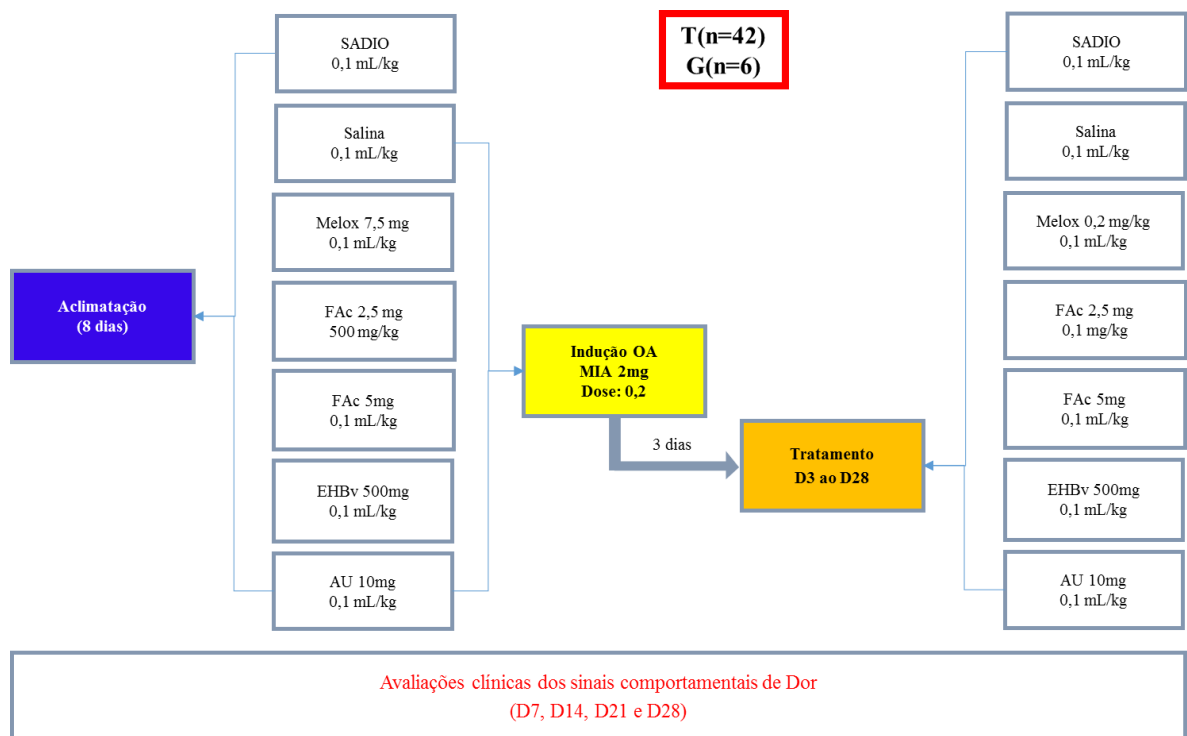


Figura 4 Representação do fluxograma de distribuição dos grupos do desenho experimental

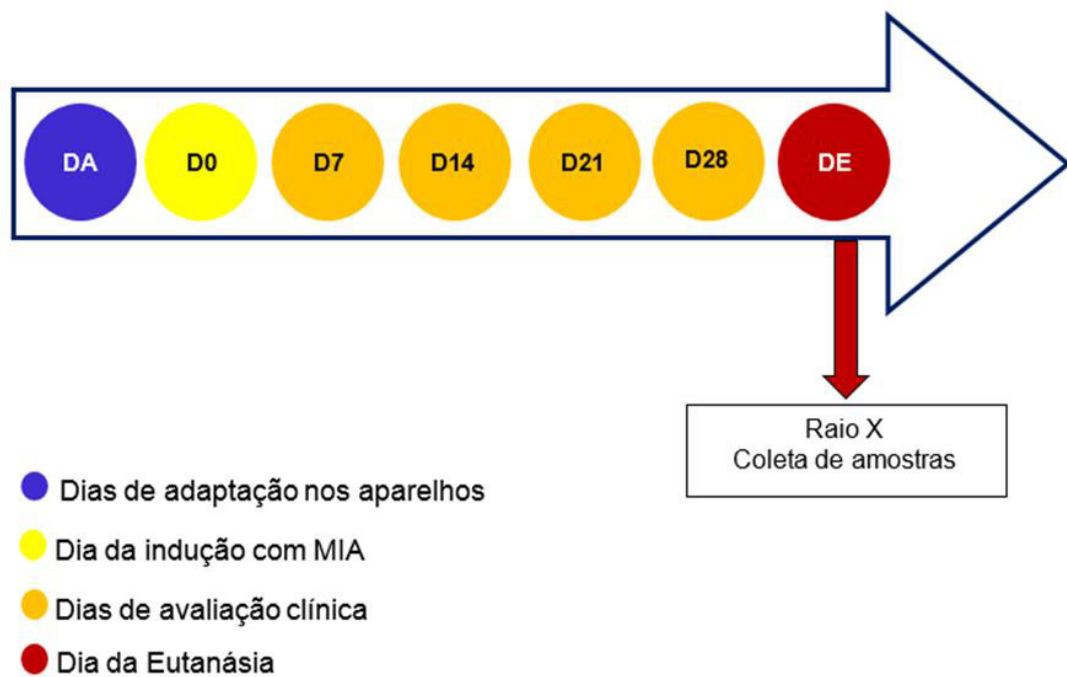


Figura 5 Esquema representativo da linha do tempo do desenho experimental

Análise clínica comportamental

Avaliação de Atividade Motora/Deambulação Forçada (RotaRod Test)

Os animais foram colocados no equipamento rotarod (modelo IITC Life Science, Califórnia, Estados Unidos) na velocidade de 16 rpm por um período de tempo de 300 segundos. Foi avaliado de acordo com a escala numérica, a deambulação forçada o uso ou não do membro afetado. O uso da pata foi graduado de 5 a 1, em que: 5= uso normal do membro; 4= claudicação leve; 3= claudicação grave; 2= intermitente desuso da pata afetada; 1= completo desuso da pata afetada (Monville; Torres; Dunnett, 2006).

Teste de Incapacitância/ Distribuição do Peso nas patas traseiras (Weight Bearing)

Os animais foram colocados em uma câmara de vidro angulada e posicionados, de modo que cada pata traseira repouse sobre plataformas diferentes. O peso exercido sobre cada pata traseira (mensurado em gramas) foi avaliado em um período de cinco segundos. A aferição final da distribuição do peso foi dada por uma média de três aferições (Scott et al., 1994).

$$DP (\%) = \frac{\text{Peso P.D.}}{\text{Peso P.D.} + \text{Peso P.E}} \times 100$$

Hiperalgesia Mecânica (Randall Selitto Test)

A hiperalgesia mecânica foi avaliada através do limiar nociceptivo de retirada da pata a uma pressão mecânica, utilizando um analgesímetro (modelo IITC Life Science, Califórnia, Estados Unidos). Um dispositivo em forma de cunha (área de 1,75mm²) foi aplicado à superfície dorsal das patas traseiras com uma pressão linear crescente até o animal produzir uma resposta caracterizada pela retirada da pata. Foram realizadas três aferições nas patas ipsilateral e contralateral. Um limiar de corte

de 250 g foi programado para evitar danos aos tecidos. O reflexo de retirada da pata é considerado representativo do limiar hipernociceptivo. O limiar nociceptivo de retirada da pata (LNRP) foi registrado em gramas e definido como o percentual para provocar uma retirada da pata ipsilateral afetada (Randall, Selitto, 1957; Nogueira et al, 2012).

$$\text{Limiar de Retirada (\%)} = \frac{\text{LRPD}}{\text{LRPD} + \text{LRPE}} \times 100$$

Quantificação de dor espontânea e avaliação da alodinia mecânica (Von Frey Test)

Os animais foram colocados em uma plataforma elevada dentro de caixas de plástico transparentes, adequadas para a avaliação do comportamento do animal. Uma das características da nocicepção espontânea gerada pelo processo inflamatório na articulação do joelho é a postura em flexão do membro lesado. O ato de proteção do animal após a flexão do membro foi classificado em graus, de acordo com a escala comportamental de dor subjetiva (0-5), onde 0-normal, 1- dedos retraídos, 2- pé em eversão, 3- suporte parcial do peso, 4- sem suporte de peso e proteção do membro, 5-sem contato algum do membro no solo. (Silva, 2009).

Para avaliação da alodinia mecânica foi utilizado filamento de Von Frey. Os animais foram colocados em caixas individuais de acrílico transparente sobre plataforma elevadas para permitir acesso à parte inferior dos seus corpos, sendo que estas plataformas possuem orifícios de tamanhos adequados apenas para o acesso do filamento de Von Frey. Ao tocar o filamento na parte medial da superfície plantar das patas posteriores do animal, força-se o filamento sobre a pata somente até que ele se encurve, retirando esse contato em seguida. A resposta da frequência de retirada da pata ao estímulo com filamento será medida em 10 aplicações com duração de 1 segundo cada, realizado sempre pelo mesmo avaliador. A frequência de retirada será determinada antes da indução da resposta inflamatória (resposta basal) para obter dados referentes à resposta normal dos animais e após a injeção de MIA

(resposta inflamatória), sendo observada no decorrer de todos os dias de experimento (Silva, 2009).

$$\text{Limiar de Retirada (\%)} = \frac{\text{LRPD}}{\text{LRPD} + \text{LRPE}} \times 100$$

Avaliação radiográfica

As radiografias dos joelhos dos animais foram obtidas através de aparelho de Raios X utilizados para radiografias em hospitais. As radiografias foram impressas por impressoras específica para películas de Raio X, na versão normal e negativa de acordo com as normas do fabricante.

Análise estatística

A comparação das médias dos diferentes grupos experimentais foi realizada pela análise de variância univariada (One-way ANOVA), seguida pelo teste de Newman-Keuls com $p < 0,05$. Os dados foram analisados por meio do programa Graph PadPrism 7, utilizando-se a média $\pm$ erro padrão.

Resultados

Avaliação de Atividade Motora/Deambulação Forçada (Rota Rod Test)

Sete dias após a injeção de MIA, os animais apresentaram diminuição no escore de marcha de deambulação forçada, conforme esperado devido o estabelecimento do processo inflamatório. A partir do 14º dia de tratamento foi observada uma evolução progressiva e positiva, em todos os grupos, demonstrando que o tratamento com o EHBv 500mg e FAc 2,5 mg causou uma significativa melhora

na atividade motora quando comparado ao grupo salina, mantendo-se até o dia 28. Evidencia-se que o grupo EHBv 500mg e o grupo tratado com Meloxicam ao final do tratamento apresentaram um resultado semelhante, sugerindo que o EHBV tem efeito potencial semelhante a este referido fármaco (Figura 4).

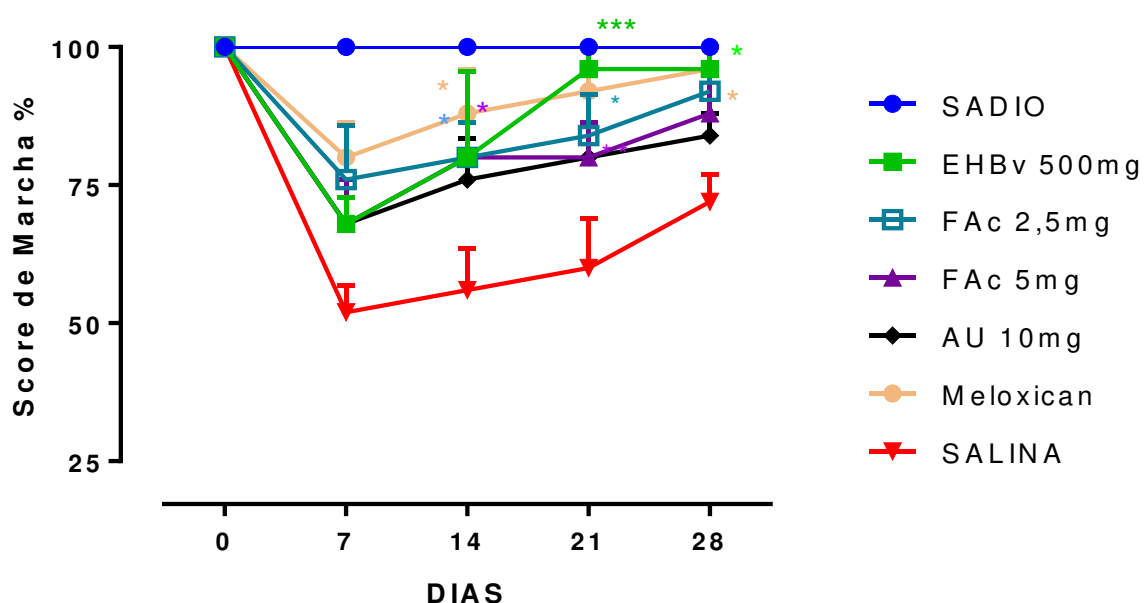


Figura 6- Avaliação da atividade motora dos animais com osteoartrite e tratados com Extrato e fração de *Borreria verticillata* (L.) G. Mey.

Teste de Incapacitância/ Distribuição do Peso nas patas traseiras (Weight Bearing)

Os animais apresentaram diminuição da distribuição de peso entre as patas, após a injeção de MIA, caracterizando a incapacitância decorrente da osteoartrite induzida. Esta diminuição ocorreu em todos os grupos experimentais no sétimo dia, exceto o grupo sadio, demonstrando eficácia do método de indução de osteoartrite por monoiodoacetato de sódio. Nos dias 14, 21 e 28 após a indução, os grupos tratados (EHBv 500mg/Kg, FAc 5 mg/ Kg, FAc 2,5 mg/ Kg, AU 10 mg/ Kg, Meloxicam

DOSE) tiveram melhora significativa na incapacitância, e diferiram significativamente do grupo salina (Figura 5)

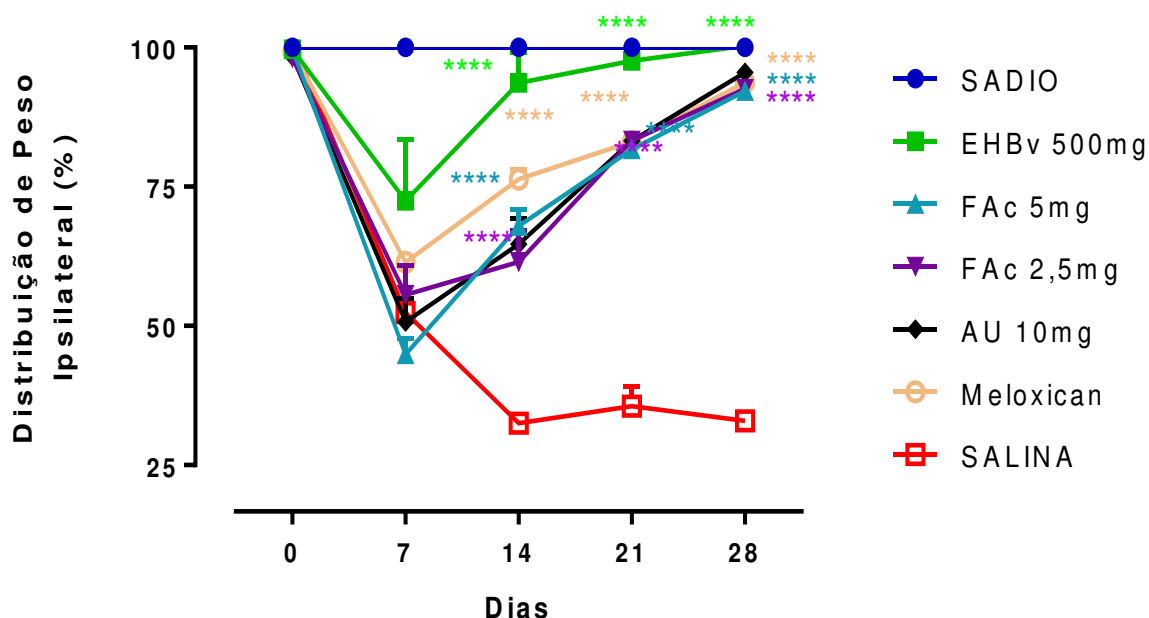


Figura 7- Avaliação de incapacitância animais com osteoartrite e tratados com Extrato e fração de *Borreria verticillata* (L.) G. Mey.

Hiperalgesia Mecânica (Randall Selitto Test)

Os animais apresentaram diminuição do limiar nociceptivo de retirada da pata também no sétimo dia após a injeção de MIA. Esta diminuição ocorreu em todos os grupos tratados com EHBv 500mg, FAc 2,5mg e 5,0mg além dos grupos AU e Meloxicam. No décimo quarto dia de experimento, o grupos tratado com EHBV foi estatisticamente diferente do grupo tratado com salina($p=0.0001$) os demais grupos apresentaram aumento no limiar nociceptivo de modo estatisticamente significativo a partir do 21 dia de tratamento. Tal melhora se traduz como melhora na hiperalgesia mecânica (Figura 6)

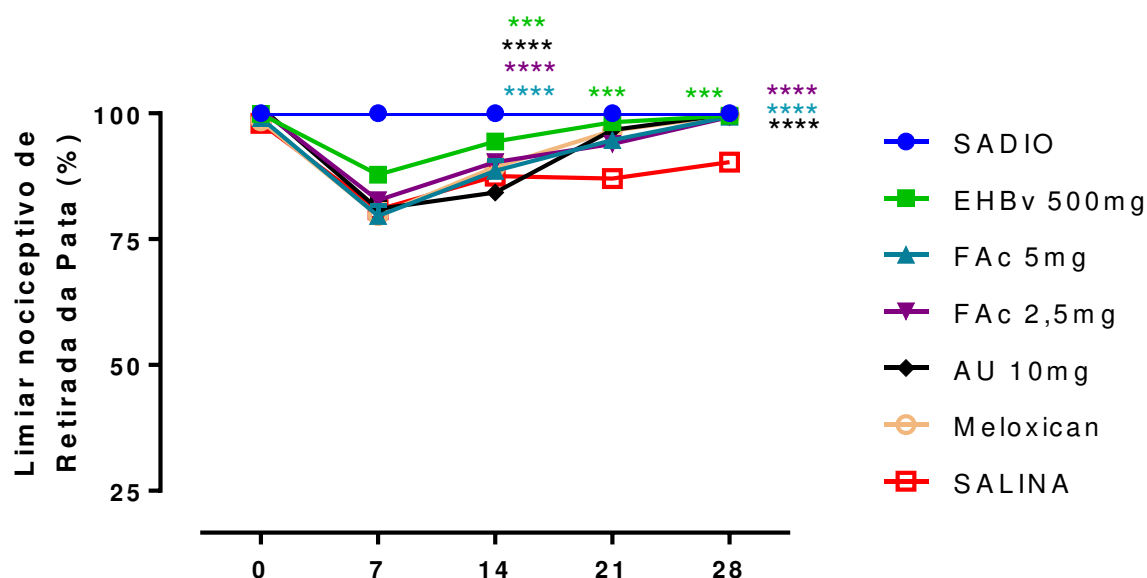


Figura 8- Avaliação da hiperalgesia mecânica dos animais com osteoartrite e tratados com extrato e fração de *Borreria verticillata* (L.) G. Mey..

Quantificação de dor espontânea e avaliação da alodinia mecânica (Von Frey Test)

A partir da análise quantitativa da alodinia mecânica, observou-se que no sétimo de tratamento o grupo salina teve diminuição máxima de sensibilidade o que demonstrou a efetiva indução do processo osteoatrítico quando colacionamos ao grupo de animais saudáveis. No dia 14 o EHBv foi estatisticamente diferente da salina sugerindo uma melhora devido o tratamento com o extrato ($p=0.2557$), melhora que se observa até o final do tratamento. Essa melhora também pode ser observada com a FAc 2,5mg e 5mg a partir do dia 21 quando comparada com a salina ($p=>0.9999$) respectivamente. O ácido ursólico apresentou cinética de efeito semelhante as frações, sendo estatisticamente diferente da salina a parti do dia 21.

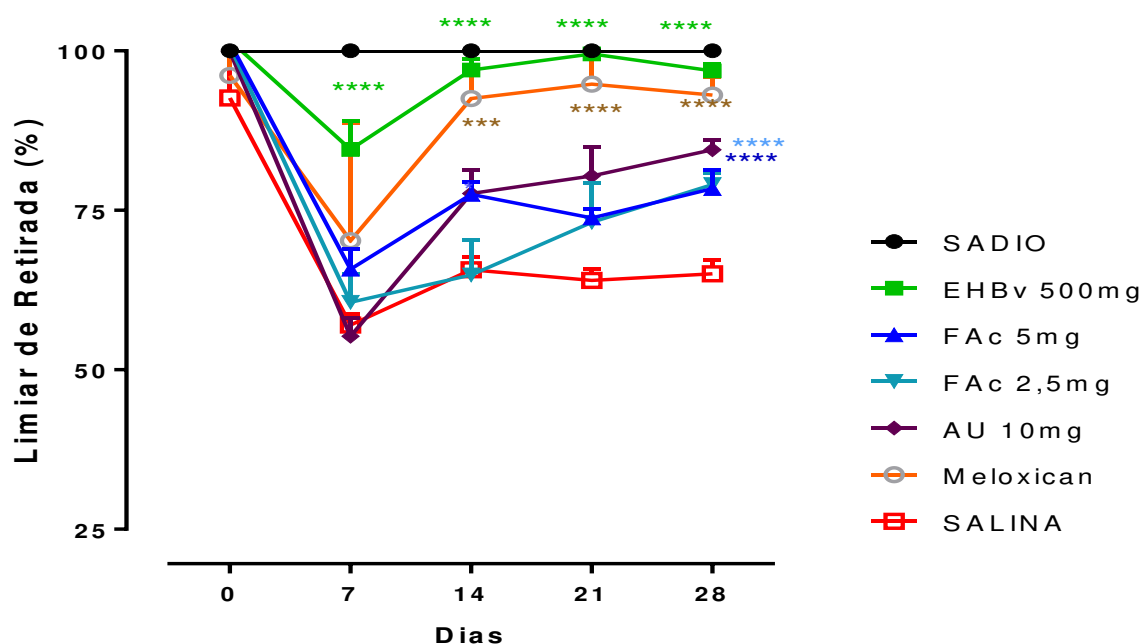


Figura 9 - Avaliação da sensibilidade tátil dos animais com osteoartrite e tratados com extrato e fração de *Borreria verticillata* (L.) G. Mey.

Parâmetros radiológicos

As análises radiográficas dos joelhos dos ratos mostraram diferenças nos graus de acordo com o sistema de Kellgren e Lawrence, conforme indicados no Figura 10. Os animais sadios (Grupo SALINA) apresentaram-se normais. O grupo EHBv 500mg já apresentou grau $2,8 \pm 0,37$, caracterizando modificação nos osteófitos e possível deformidade articular. O grupo FAc 2,5mg demonstrou um resultado semelhante, com grau $2,8 \pm 0,49$.

Os grupos FAc 5mg e grupos AU apresentaram grau $2,4 \pm 0,24$, o que caracteriza a presença de osteófitos definitivos, e estreitamento ausente ou questionável do espaço articular. O grupo SALINA já mostra um grau mais elevado ($3,0 \pm 0,32$), indicando osteófitos moderados, estreitamento definitivo, alguma esclerose, possível deformidade articular. Já o grupo Meloxican, nosso controle positivo, indica o menor grau radiológico de osteoartrose ($1,6 \pm 0,24$).

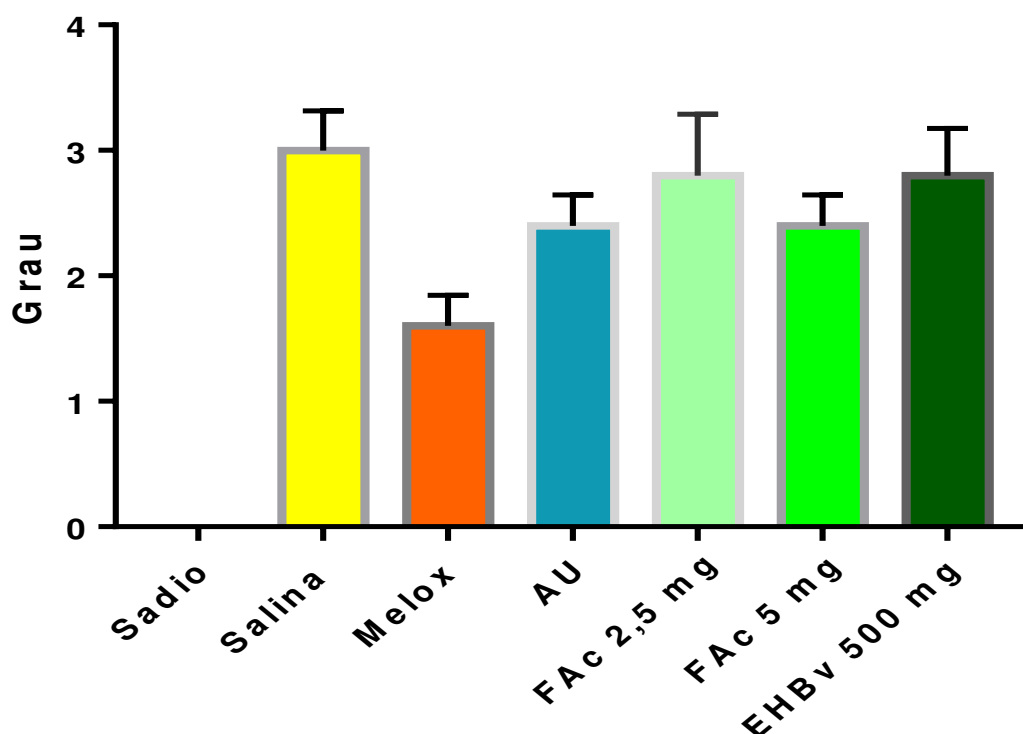


Figura 10- Graus radiográfico de ratos tratados com frações e extratos de *Borreria verticillata* (L.) G. Mey. Os valores estão indicados em médias $\pm$ S.E.M (n=6).

Discussão

Os animais por não possuírem a capacidade de comunicar verbalmente a ocorrência de dor, quando submetidos a um estímulo reconhecidamente nociceptivo, eles expressam através de respostas comportamentais, motoras e fisiológicas. A partir da avaliação desses parâmetros podemos inferir que um animal está experimentando uma resposta analgésica. Partindo desse pressuposto (Silva, 2017), a atividade farmacológica do extrato hidroetanólico bruto e fração acetato de etila da *Borreria verticillata* (L.) G. Mey. apresenta efeito analgésico (Bejamin, 1979; Fernandes, 2007; Conserva, et al., 2012; Abdullahi-Gero et al., Silva, 2017).

Ao longo do desenvolvimento do desenho experimental, observou-se uma melhora dos sinais de dor com o aumento do limiar nociceptivo periférico através dos

testes de Vonfrey, rotarod e Weight Bering. Para os testes de atividade motora e deambulação forçada (Figura 4), alodinia mecânica e incapacidade funcional o extrato e a fração apresentaram melhora da nocicepção, principalmente na fase aguda da inflamação através da melhora do escore de marcha, do aumento tátil sensitivo e da distribuição da descarga de peso nas patas traseiras.

Após a fase de controle de reação inflamatória principalmente na fase aguda (7 dias de pós-operatório), foi observado nos animais não tratados uma caminhada regular no teste de deambulação forçada (Figura 4). Silva (2018), sugere que, tal comportamento seja uma readaptação do animal para disfarçar a dor, como mecanismos de defesa para enfrentar os predadores. Corroborando com o teste de Incapacitância / Distribuição do Peso nas patas traseira, tiveram resultados diferentes entre o peso das patas, a pata induzida com menor valor comparado a pata livre de indução, levando a concluir que houve sobrecarga na pata sem indução (Pelletier, 2004; Monville, 2016; Felland, 2011; Felson, 2013).

No estudo de Vidotto (2013), o grupo com sete dias de pós operatório apresentou a proliferação de tecido fibroso no joelho. Essa formação de fibrocartilagem na articulação pode ocasionar alterações biomecânicas e funcionais que podem causar um ajuste postural através de um reflexo de proteção ao joelho lesionado, suportando menos peso, mantendo a articulação em flexão para minimizar a dor (kaufman et al., 2001), levando a uma marcha claudicante como demonstrado nos resultados da pesquisa.

Esses estudos reforçam a similaridade da medicação com a espécie vegetal, sugerindo que o extrato de etanol e a fração acetato de etila da *Borreria verticillata* (L.) G. Mey. tem um efeito similar ao meloxicam, atuando possivelmente na fase aguda da inflamação através da inibição do ciclo da COX-2 no ácido araquidônico, o que pode levar a uma possível diminuição da dor e da degeneração da cartilagem articular através da redução da nocicepção primária, edema e moléculas pró-inflamatórias (Roughan JV et al., 2016), como demonstrado nos índices de melhora através dos testes de alodinia mecânica e incapacidade funcional. A inibição da COX 2 também já foi evidenciada em estudos desenvolvidos por Silva (2017).

O aparecimento de sinais radiológicos de osteoartrite pode ser importante para validar o método. Este estudo em fase crônica mostrou sinais de degeneração articular, estreitamento do espaço articular, esclerose óssea, osteófitos em todos os grupos de animais. Entretanto, os grupos tratados com FAc 5mg/Kg apresentaram melhora significativa em relação aos grupos. (Silva, 2017; Silva, T, 2018)

Comparando as alterações de monoiodoacetato de sódio causadas na cartilagem ratos com cartilagem humana, nas imagens radiológicas, corroboram com resultados encontradas em outros estudos, afirmando que o modelo experimental utilizado é um instrumento importante para o estudo de novas substâncias que podem ser utilizadas em seres humanos (Pelletier, 2004; Guzman, 2003; Combre, 2004; Kashyap, 2016; Moraes, 2016).

Este estudo corrobora com os achado de Silva (2017) que nos tratamentos com EHBv, FAc 25 e 50 o efeito antinociceptivo pode ser predominantemente atribuído a ações periféricas, incluindo a participação de componentes antiinflamatórios. O ácido ursólico é o principal componente ativo e parece ser uma fonte promissora de inibidores da COX-2 e antagonistas do receptor de NMDA e portanto utilizado aqui neste estudo como parâmetro positivo (Ma, 2014; Silva, 2017).

Portanto, mensurar a dor do ponto de vista sensorial e perceptivo em conjunto em experimentos com animais é extremamente importante, pois o estímulo doloroso não pode ser considerando somente em sua magnitude como uma simples dimensão univariável e unitária variando em qualidade e intensidade sensoriais e também não pode ser considerada somente do ponto de vista da percepção como uma experiência multidimensional (Da Silva JA; Ribeiro-Filho, 2011), logo, a melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na geração, modulação, amplificação e perpetuação da dor, assim como sua inibição, como possivelmente ocorreram no estudo, desempenham um papel importante na determinação do melhor esquema terapêutico para OAJ, não só do ponto de vista de seu controle sintomático, mas dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos melhorando a dor, a função e qualidade de vida.

Este estudo teve como limitação avaliar a dor somente do ponto de vista periférico e de sua percepção, sugere-se que sejam realizados novos estudos avaliando o componente central da dor na Osteoartrite de Joelho seriam importantes,

pois, diante do exposto, os resultados comprovam a ação antinociceptiva e analgésica do EHBv e da fração de acetato de etila no quadro doloroso da osteoartrite, porém, outras investigações farmacológicas são necessárias para se sugerir se existem outros o(s) mecanismo(s) da ação antinociceptiva nesta condição crônica debilitante.

Referências

Abdullahi-Gero, et al., Evaluation Of Antioxidant Activity Of Leave Extract Of *Borreria Verticillata* Linn (Rubiaceae). Journal Of Natural Sciences Research., V. 9, P. 25-30, 2014b.

Abdullahi-Gero, et al., Preliminary Evaluation Of Ethanol Leaf Extract Of *Borreria Verticillata* Linn (Rubiaceae) For Analgesic And Anti- Inflammatory Effects. Journal Of Medicinal Plant Research, V.8, N.20, P. 736-747, 2014a.

Alves S. M., Abreu S. C., Lemos J. C., Gomes F. I. F., Alves S. M., Do Val D. R., Et al.. Anti-Inflammatory And Anti-Nociceptive Effects Of Strontium Ranelate On The Zymosan-Induced Temporomandibular Joint Inflammatory Hypernociception In Rats Depend On TNF- α Inhibition. Pharmacol. 2017 Rep. 69 764–772. 10.1016/J.Pharep.2017.03.007

Appleton I. et al., . The Pharmacology Of Pain. Heidelberg: Library Of Congress, 1997. P. 42-54.

Benjamin, T.V. Investigation Of *Borreria Verticillata*, An Antieczematic Plant Of Nigeria. Quarterly Journal Of Crude Drug Research, V. 17, P. 135-6, 1979.

Combe, R.; Bramwell, S.; Field, M. J. The Monosodium Iodoacetate Model Of Osteoarthritis: A Model Of Chronic Nociceptive Pain In Rats? Neuroscience Letters, V. 370, N. 2, P. 236-240, 2004.

Conserva, L.M.; Ferreira, J.J.C. *Borreria* And *Spermacoce* Species (Rubiaceae): A Review Of Their Ethnomedicinal Properties, Chemical Constituents, And Biological Activities. Pharmacognosy Reviews, V.6, N. 11, P. 46-55, 2012.

Felson, D.T.. Osteoarthritis As A Disease Of Mechanics. Osteoarthritis Cartilage. 21, 10-15. Berenbaum, F. 2013. Osteoarthritis As An Inflammatory Disease (Osteoarthritis Is Not Osteoarthrosis!). Osteoarthritis Cartilage. 21, 16-21, 2013

Ferland, C. E, Et al., Gait Analysis And Pain Response Of Two Rodent Models Of Osteoarthritis. *Pharmacology Biochemistry And Behavior*, V.97, N. 3, P. 603-610, 2011.

Fernandes, E.S. Et al.. Anti-Inflammatory Effects Of Compounds Alpha-Humulene And (-)-Trans-Caryophyllene Isolated From The Essential Oil Of *Cordia Verbenacea*. *Eur Journal Of Pharmacology*, V.569, N. 3, P. 228-36, 2007.

Fernihough J., Gentry C., Malcangio M., Fox A., Rediske J., Pellas T., Et al. (2004). Pain-Related Behavior In Two Models Of Osteoarthritis In Rat Knee. *Pain*. 112 83–93. 10.1016/J.Pain. 2004

Guzman, R. E.; et al., Mono-Iodoacetate-Induced histologic Changes In Subchondral Bone And Articular Cartilage Of Femorotibial Joints: An Animal Model Of Osteoarthritis. *Toxicologic Pathology*, V. 31, N. 6, P. 619-624, 2003.

Kashyap, D., Tuli, H. S., And Sharma, A. K.. Ursolic Acid (UA): A Metabolite With Promising Therapeutic Potential. *Life Sci*. 2016, 146, 201–213. Doi: 10.1016/J.Lfs.2016.01.017

Kaufman KR; Hughes C; Morrey BF; Morrey M; A. KN. Gait characteristics of patients with knee osteoarthritis. *J Biomech*, v. 34, p. 907-915, 2001.

Kwan TS, Lajeunesse D, Pelletier J, et al. Targeting Subchondral Bone For Treating Osteoarthritis: What Is The Evidence? *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2010;24:51-70.

Ma, J. Q., Ding, J., Zhang, L., And Liu, C. M. . Ursolic Acid Protects Mouse Liver Against Ccl4-Induced Oxidative Stress And Inflammation By The MAPK/NF-Kb Pathway. *Environ. Toxicol. Pharmacol*. 2014, 37, 975–983. Doi: 10.1016/J.Etap.2014.03.011

Monville C; Torres E; Dunnett S. Comparison Of Incremental And Accelerating Protocols Of The Rotarod Test For The Assessment Of Motor Deficits In The 6-OHDA Model. *Journal Neurosc Methods*, Vol 158, Issue 2, 15 December 2006, Pages 219–223.

Morais SV, Et Al. Osteoarthritis Model Induced By Intra-Articular Monosodium Iodoacetate In Rats Knee. Acta Cir Bras. 2016

Moreira, V. F. et al New Chemical Constituents From *Borreria Verticillata* Mey (Rubiaceae). Helvetica Chimica Acta, N. 93, N.9, P. 1751–1757, 2010.

Murtala, Y. et al. Effect Of Aqueous Leaf Extract Of *Borreria Verticillata* Of Sudan o- Sehelian Savanna On Ccl4 Induced Hepatotoxicity. Journal Of Natural Sciences Research, V.24, P.67-72, 2015.

Nogueira E.S.; Castro E.R.; Mancuso R.; Navarro X. Randall-Selitto Test: A New Approach For The Detection Of Neuropathic Pain After Spinal Cord Injury. J Neurotrauma. 2012 Mar 20;29(5):898-904.

Pelletier, J-P. Pathophysiology Of Osteoarthritis. Osteoarthritis And Cartilage, V. 12, P. 31-33, 2004. Supplement 1.

Randall L. O., Selitto J. J. A Method For Measurement Of Analgesic Activity On Inflamed Tissue. Arch. Int. Pharmacodyn. Ther. 1957, 111 409–419.

Rezende MU, Campos GC, Pailo AF. Conceitos Atuais Em Osteoartrite. Acta Ortopetica Brasileira 2013; 21:120-122. [Http://Dx.Doi.Org/10.1590/S1413-78522013000200010](http://dx.doi.org/10.1590/S1413-78522013000200010)

Rodrigues T. A., Sampaio A. J. B., Jr., Nunes I. D. P., Cartágenes M. S. S., Garcia J. B. S. (2017). Effect Of Strontium Ranelate On Pain Behavior In An Experimental Model Of Osteoarthritis. Braz. J. Med. Biol. Res. 50:E6314 [10.1590/1414-431X20176314](https://doi.org/10.1590/1414-431X20176314) [PMC Free Article] [Pubmed] [Crossref]

Rodrigues, M. R., Kanazawa, L. K., Das Neves, T. L., Da Silva, C. F., Horst, H., Pizzolatti, M. G., Et Al. (2012). Antinociceptive And Anti-Inflammatory Potential Of Extract And Isolated Compounds From The Leaves Of *Salvia Officinalis* In Mice. J. Ethnopharmacol. 139, 519–526. Doi: 10.1016/J.Jep.2011.11.042

Rodrigues, Thiago A et al., Prophylactic And Therapeutic Use Of Strontium Ranelate Reduces The Progression Of Experimental Osteoarthritis Frontiers In Pharmacology Vol. 9 975. 19 Sep. 2018, Doi:10.3389/Fphar.2018.00975

Salter, R. B. Distúrbios e Lesões do Sistema Musculoesquelético. 3. Ed. Rio De Janeiro: Medsi, 2001. 699p.

Schott E, et al., Weight bearing as an objective measure of arthritic pain in the rat. J Pharmacol Toxicol Meth 1994, 31:79-83.

Shukla, S. et al. Studies On Antiinflammatory, Antipyretic And Analgesic Properties Of Caesalpinia Bonducella F. Seed Oil In Experimental Animal Models. Food And Chemical Toxicology, V. 48, P. 61-64, 2010.

Silva A., Andersen M. L., Tufik S. (2008). Sleep Pattern In An Experimental Model Of Osteoarthritis. Pain 140 446–455. 10.1016/J.Pain.2008.09.025 [Pubmed] [Crossref]

Silva RHM, et al, Antinociceptive Activity Of *Borreria Verticillata*: In Vivo And In Silico Studies. Front Pharmacol. 2017.

Silva, L.E. Et Al. Hydrotherapy Versus Conventional Land-Based Exercise For The Management Of Patients With Osteoarthritis Of The Knee: A Randomized Clinical Trial. Physical Therapy, V. 88, N. 1, P. 12-21, 2008.

Silva, Morgana Duarte Da. Estudos Comportamentais E Farmacológicos Com A Diacereína No Modelo De Monoartrite Induzida Por Adjuvante Complete De Freund (Efa) Em Ratos. 2009. 79f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal De Santa

Staud R; Craggs JG; Robinson ME; Perlstein WM; P. DD. Brain activity related to temporal summation of C-fiber evoked pain. Pain, v. 129, n. 1-2, p. 130-142, 2007.

Woolf CJ; S. MW. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. Science, v. 288, p. 1765-1769, 2000.

Ximenes, A.C.; Melo, A.M.P.; Custodio, D.M.E.J. Dor Osteoarticular. In: Alves Neto, O. (Org.). Et Al. Dor: Princípios E Prática. Porto Alegre: Artmed, 2009. Cap. 40, P. 486-490.

Pitcher, T., Sousa-Valente, J., & Malcangio, M. "The Monoiodoacetate Model of Osteoarthritis Pain in the Mouse" Journal of visualized experiments: JoVE, 111 53746. 16 May. 2016, doi:10.3791/53746

Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. PLoS Biol. 2010; 8(6):e1000412. Published 2010 Jun 29.

Nair AB, Jacob S. A simple practice guide for dose conversion between animals and human. Journal of Basic and Clinical Pharmacy. 2016;7(2):27–31

Nagy E, Vajda E, Vari C, Sipka S, Fárr AM, Horváth E. Meloxicam ameliorates the cartilage and subchondral bone deterioration in monoiodoacetate-induced rat osteoarthritis. PeerJ. 2017;5:e3185.

6. CONCLUSÃO

- ✓ O extrato produziu melhoras significativas em todos os parâmetros clínicos avaliados, com aumento no limiar nociceptivo, reduzindo a hiperalgesia mecânica;
- ✓ Produziu aumento da atividade motora e redução da incapacitância;
- ✓ A espécie *Borreria verticillata* para o tratamento de Osteoartrite, revela ser um composto promissor para o desenvolvimento de fármacos utilizados para analgesia.

ANEXO A – Certificado do Comitê de Ética



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS-CEUA
CIAEP: 01.0341.2014

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "*Análise da ação da *Borrelia verticillata* (L.) G. Mey. em modelo experimental de osteoartrite em rato*" registrada com o nº 23115.013422/2016-29, sob a responsabilidade de Maria do Socorro de Sousa Cartágenes, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi considerado **Aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA- UFMA) da Universidade Federal do Maranhão.

FINALIDADE	() Ensino (x) Pesquisa () Extensão
Vigência da autorização	01/03/2017 à 31/12/2018
Especie/linhagem/raça	<i>Rattus norvegicus</i> WISTAR
Nº de animais	50
Peso/Idade	250 à 300 mg/ 45 dias
Sexo	Machos e fêmeas
Origem	Biotério Central – UFMA

Lucilene Amorim Silva

Profa. Dra. Lucilene Amorim Silva
 Presidente da Comissão de Ética no uso de animais-CEUA
 UFMA